



Etude de l'établissement des réservoirs VIH lors de la primo-infection et de l'impact des traitements antirétroviraux très précoces sur ces réservoirs

Antoine Chéret

► To cite this version:

Antoine Chéret. Etude de l'établissement des réservoirs VIH lors de la primo-infection et de l'impact des traitements antirétroviraux très précoces sur ces réservoirs. Virologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T013 . tel-01059807

HAL Id: tel-01059807

<https://theses.hal.science/tel-01059807>

Submitted on 2 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale 157

Génétique-cellule-Immunologie-Infectiologie-Développement-« Gc2iD »

Equipe d'accueil 7327

Etude de l'établissement des réservoirs VIH lors de la primo-infection et de l'impact des traitements antirétroviraux très précoces sur ces réservoirs

Par Monsieur Antoine CHERET

Thèse de doctorat d'Infectiologie

Dirigée par Madame le Professeur Christine ROUZIOUX

Présentée et soutenue publiquement le 24 avril 2014

Devant un jury composé de :

Président du jury :	Monsieur Olivier LORTHOLARY	Professeur des Universités
Rapporteur :	Monsieur Philippe MORLAT	Professeur des Universités
Rapporteur :	Madame Constance DELAUGERRE	Maître de conférences des Universités
Examineur :	Monsieur Gianfranco PANCINO	Directeur de Recherches

Résumé :

La primo-infection est un moment critique de l'établissement du réservoir justifiant de l'initiation d'un traitement précoce.

Nous avons initié un essai randomisé évaluant l'impact de deux ans d'un traitement antirétroviral intense (essai ANRS147 OPTIPRIM, trithérapie *versus* pentathérapie) sur le réservoir et avons initié des études physiopathologiques au cours de cet essai.

Nous montrons ainsi la faible diversité génétique des virus en primo-infection dans les compartiments sanguins et rectaux. Le réservoir s'établit dès le premier mois de l'infection par diffusion d'un cluster viral homogène au sein des lymphocytaires T CD4 naïfs (TN) et mémoires centrales (TCM), transitionnelles (TTM), effectrices (TEM) quiescents. Il en résulte une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire associée à une faible contribution au réservoir des cellules peu différenciées à longue demi-vie, TN et TCM. Par ailleurs nous montrons que la majorité des patients au moment de leur primo-infection n'ont pas la capacité de développer des réponses T CD8 à même de supprimer la réplication virale comme chez les patients *HIV Controllers*. Après deux ans de traitement, nous observons que la diversité virale n'a pas évolué, par contre la taille du réservoir est fortement réduite. Les anomalies de l'homéostasie lymphocytaire T CD4 persistent, par contre le traitement très précoce a permis de protéger les TN et TCM. Il n'y a pas de bénéfice additionnel d'une pentathérapie mais nous avons validé le concept qu'un traitement précoce permet d'induire un contrôle virologique au long cours après arrêt de traitement. Nos résultats indiquent qu'un traitement plus long que deux ans permettrait de renforcer la diminution du réservoir.

Ces résultats seront à prendre en compte pour l'élaboration de futurs essais en primo-infection visant à réduire le réservoir pour une rémission au long cours.

Title : Study of the establishment of the HIV-1 reservoirs at the time of the primary infection and impact of a Highly Active Anti-retroviral Therapy on these reservoirs

Abstract :

HIV primary infection is a critical period in the establishment of the reservoirs that justifies the initiation of an early treatment.

We started a randomised trial to assess the impact of a two-year intense HAART (ANRS147 OPTIPRIM trial: five-drug therapy *versus* three-drug therapy) on the blood reservoir; within this trial, we included some pathophysiological studies.

Thus, we show that during the primary infection, viruses have a low genetic diversity in blood and rectal compartments. The reservoir establishes itself as early as the first month of the infection by spreading a homogeneous viral cluster in CD4 T cells subsets, naive T cells (TN), central memories (TCM), transitional memories (TTM), effector memories (TEM), and resting T cells. This results in a disruption of the lymphocyte homeostasis, linked to the low contribution to the reservoir of TN and TCM, which are little differentiated cells with long half-lives. Moreover, we show that, at the time of the primary infection, the majority of patients do not have the ability to develop CD8 T cells responses that could suppress the viral replication, as *HIV Controllers* patients do. After two years of treatment, we observe that there is no evolution of the viral diversity, but the size of the reservoir is significantly reduced. The abnormalities of the CD4 T cells lymphocyte homeostasis remain, but the very early treatment was able to protect the TN and TCM. The five-drug therapy does not have any additional benefit, but we confirm the idea that early treatment can induce long-term virological control after the discontinuation of the treatment. Our results show that a treatment lasting more than two years would be able to reinforce the reduction of the reservoir.

These results should be taken into account in the development of future trials aiming to reduce the reservoir in patients treated at the time of primary infection for a sustainable remission.

Key words: HIV reservoir, primary infection, early treatment, viral diversity, T cells subsets infection

Mots clés : Réservoir VIH, Primo-infection, traitement précoce, diversité virologique, infection des sous-populations lymphocytaires

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à **Madame le Professeur Christine Rouzioux** à qui je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance et ma très grande estime, pour son enseignement, ses conseils «savoir-faire et faire savoir», son enthousiasme, ses encouragements «sans cesse sur le métier remettez votre ouvrage», sa patience et ses cours d'anglais, sa constante bienveillance à mon égard, sa très grande disponibilité et son soutien sans faille dans mes projets professionnels, pour la confiance qu'elle a bien voulu m'accorder et pour m'avoir fait découvrir et partager sa passion de la recherche. Cette rencontre professionnelle et humaine est un évènement précieux et déterminant dans ma vie.

Je tiens à exprimer ma très grande reconnaissance et mon amitié à **Madame le Professeur Laurence Meyer** pour m'avoir toujours guidé avec prévenance et générosité dans les méandres de la méthodologie des essais et des statistiques dès le début d'OPTIPRIM, son sens du travail en équipe avec le souci du respect de chacun, son accueil toujours sympathique au sein de son service et pour la richesse de nos échanges.

Ce travail a été possible grâce à la précieuse collaboration avec **Madame le Professeur Brigitte Autran** que je remercie sincèrement pour ses conseils, son écoute, son soutien, sa réactivité, pour les discussions enrichissantes et la qualité des échanges tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Cette collaboration m'a permis de découvrir ma co-autrice **Madame Charline Bacchus** qui depuis s'est envolée outre Atlantique, avec sa bonne humeur, ses compétences en Immunologie et dans le maniement des logiciels de traitement des données biologiques et des nouvelles technologies qui ont été un atout indispensable à l'aboutissement de nos travaux ce que j'ai su apprécier et j'espère la retrouver pour d'autres aventures.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Virologie et particulièrement à **Madame Adeline Mélard**, pour leur accueil, leur sympathie, leur aide, leur disponibilité qui ont été un atout clef pour mener ce travail à terme.

Je remercie très amicalement les membres de l'équipe d'accueil EA 7327, **Madame le Docteur Véronique Avettand-Fenoël, Monsieur le Docteur Jade Ghosn, Monsieur le Docteur Pierre Frange et Monsieur le Professeur Jean-Paul Viard**, pour leur soutien régulier, leurs critiques constructives qui m'ont permis d'avancer dans la réflexion et l'élaboration de ce travail.

Aux rapporteurs de ce travail, **Monsieur le Professeur Philippe Morlat et Madame le Docteur Constance Delaugerre**, j'exprime toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mon travail en me faisant l'honneur d'avoir accepté de le juger et les remercie pour leurs conseils et leur bienveillance qui ont permis d'enrichir ce manuscrit.

Je remercie **Monsieur le Professeur Olivier Lortholary** de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie **Madame le Professeur Christine Katlama** pour son soutien et le groupe AC5 Stratégie de l'ANRS qui ont permis au protocole OPTIPRIM de voir le jour.

Je remercie l'ANRS, **Monsieur le Professeur Jean-François Delfraissy** et **Monsieur le Professeur Jean-Michel Molina** pour leurs contributions indispensables à la réalisation du protocole OPTIPRIM.

Un grand merci à **Madame Sandrine Couffin-Cardiergues** et **Madame Juliette Saillard** qui ont su m'accompagner au fil de mes aventures à l'ANRS avec enthousiasme et sympathie.

Je remercie également les **Docteurs Marie-Laure Chaix** et **Marianne Leruez-Ville**, pour leurs conseils, leurs compétences et leur bonne humeur qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier **Monsieur le Professeur Patrick Berche** qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire pour mener à bien ce travail.

Je remercie le Centre Hospitalier de Tourcoing et Messieurs les **Professeurs Eric Senneville** et **Yazdan Yazdanpanah** de m'avoir accordé la disponibilité nécessaire à l'accomplissement de ce travail et pour leurs encouragements.

Je tiens à remercier toute l'équipe du protocole OPTIPRIM, le centre de Méthodologie et de Gestion de **Madame le Professeur Laurence Meyer**, **Monsieur le Docteur Georges Nembot** très sympathique chef de projet de l'essai pour son investissement dans l'essai OPTIPRIM, **Monsieur le Docteur Faroudi Boufassa**, **Monsieur Laurent Tran** pour leur aide et leur contribution à ce travail. Je remercie **Monsieur le Professeur Daniel Olive**, **Monsieur le Docteur Alain Venet**, **Madame Camille Lecuroux**, pour le versant immunologique de l'essai et leur soutien ces dernières années. Je remercie également mes acolytes du commencement d'OPTIPRIM qui me sont chères, **Mesdames les Docteurs Caroline Lascoux** et **Christiane Deveau**

Un grand merci à toute l'équipe de PRIMO, à **Madame le Professeur Cécile Goujard** pour son écoute et ses conseils avisés, à **Madame le Docteur Asma Essat** pour sa disponibilité et sa réactivité.

Merci à mes collègues du sud, **Madame le Docteur Isabelle Ravaux**, **Madame le Docteur Catherine Tamalet**, **Monsieur le Docteur Halphon Philippe**, **Monsieur le Docteur Alain Lafeuillade** pour leur soutien dans la réalisation du protocole OPTIPRIM.

Je remercie tous les patients qui ont accepté de participer à ce travail de recherche.

J'adresse tous mes remerciements à l'équipe d'AFORIH pour son soutien à la réalisation de ce travail, **Josiane et Marc Jacquard**, **Joëlle Duvernay**, **Monique Toussaint** et **Patrice Quillet** avec lesquels j'espère encore partager d'autres aventures.

Ce travail a pris une grande place dans mon champ de vie ces dernières années et il appartient donc également à **mes parents**, **mes proches** et **Christophe** que je remercie pour leur soutien inconditionnel et indispensable.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
APOBEC	<i>APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide</i>
ARN	acide ribonucléique
ATP	adenosine-5'-triphosphate
Cpag	Cellules présentatrice d'antigène
CCR5	<i>C-C Chemokine Receptor type 5</i>
CXCR4	<i>Chemokine Receptor type 4</i>
DC	Cellule Dendritique (<i>Dendritic Cell</i>)
DC-sign	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin</i>
EC	<i>Elite Controller</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	précurseurs polyprotéiques de glycoprotéines d'enveloppe
FDC	<i>Follicular Dendritic cell</i>
Gag	précurseurs polyprotéiques de protéines associées à l'ARN et de la capside
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HDACi	Inhibiteur d'histone-désacétylases (Histone DeACetylase inhibitor)
HIC	<i>HIV Controller</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antigène des leucocytes humain)

IC	Intervalle de confiance
I-FABP	<i>Intestinal-Fatty-acid-binding proteins</i>
IL	Interleukine
INF	Interféron
INTI	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
INNTI	Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteur de protéase
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
ITI	Inhibiteur d'intégrase
KIR3DL1	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1</i>
MIP1 α	<i>Macrophage inflammatory protein [MIP]-1 alpha</i>
MIP1 β	<i>Macrophage inflammatory protein [MIP]-1 beta</i>
Nef	<i>Negative regulator factor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kB</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Cellules mononuclées du sang périphérique)
PCR	<i>Polymérase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death-1</i>
PDC	<i>Plasmacytoïde Dendritic Cell</i>
Pol	Précurseurs olyprotéiques d'enzymes virales (reverse transcriptase, intégrase, polymérase)

PTC	Contrôleur après de traitement (<i>Post-Treatment Controller</i>)
p-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
PVVIH	Personnes vivants avec le VIH
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T cell expressed and Secreted</i>
Rev	<i>Regulator of Expression of Virion Proteins</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIDA	Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise
STCM	<i>Stem T Central Memory Cell-Cellule Souche T Mémoire</i>
TAR	<i>Trans-Activating Response element</i>
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
T CD4 A	Lymphocyte T CD4 activé
TN	Lymphocyte T Naïf (Naive T lymphocyte)
TCM	Lymphocyte T Mémoire Central (Central-Memory T lymphocyte)
TTM	Lymphocyte T Mémoire Transitionnel (Transitional-Memory T lymphocyte)
TEM	Lymphocyte T Mémoire Effecteur (Effector-Memory T lymphocyte)
IUPM	<i>Infectious Units Per Million cells</i>
Vif	<i>Virion Infectivity Factor</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vpr	<i>Viral Protein R</i>
Vpu	<i>Viral Protein U</i>
WB	<i>Western-Blot</i>

SOMMAIRE

RESUME :	1
REMERCIEMENTS	2
LISTE DES ABREVIATIONS	4
PLAN	7
Première partie : GENERALITES	9
Introduction	9
1. Physiopathologie de la primo-infection.....	11
1.1. Aspects virologiques	11
1.1.1 Acquisition du VIH	11
1.1.2. Cycle du virus dans la cellule	12
1.1.3. Invasion virale et dissémination dans l'organisme	15
1.1.4. Diversité virale en primo-infection	17
1.2. Aspects immunologiques.....	18
1.2.1. Immunité innée	18
1.2.2. Réponses lymphocytaires spécifiques	22
1.3. Aspects diagnostiques	25
1.3.1. Principaux aspects cliniques.....	25
1.3.2. Diagnostic biologique.....	27
2. Le Réservoir VIH	30
2.1. Etablissement et maintien du réservoir quiescent.....	30
2.1.1. Infection des sous-populations lymphocytaires T CD4.....	30
2.1.2. La latence virale au niveau moléculaire : les 4 points	34
2.2. Le Réservoir en histoire naturelle.....	37
2.2.1. Quantification du réservoir.....	37
2.2.1.1. Les différentes méthodes de quantification	37
2.2.1.2. La quantification du VIH dans les PBMC en histoire naturelle	40
2.2.2. Dynamique dans les sous-populations lymphocytaires circulantes.....	41
2.2.3. Les autres cellules impliquées dans le réservoir.....	43
2.2.4. Dans les tissus	45

3. Impact des traitements en primo-infection	50
3.1. Impact Immuno-virologique.....	50
3.1.1. Impact sur le set point virologique et les lymphocytes T CD4.....	50
3.1.2. Protection des réponses immunitaires systémiques	52
3.1.3. Impact du traitement sur la Transmission et la diversité virale	54
3.1.4. Bénéfice clinique	55
3.2. Impact du traitement en primo-infection sur le réservoir	56
3.2.1. Impact du traitement sur les réservoirs évalué dans les PBMC.....	56
3.2.2. Impact du traitement sur les cellules du tissu lymphoïde de la muqueuse digestive.....	64
Conclusion.....	65
Deuxième partie : TRAVAUX.....	66
1. Rationnel de l'essai OPTIPRIM	66
2. Article I.....	70
3. Article II	85
4. Article III.....	94
5. Article IV.....	122
6. Autres travaux en cours	156
Troisième partie : DISCUSSION	159
Quatrième partie : PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAPHIE	169

Première partie : GENERALITES

Introduction

En France, le nombre de nouvelles contaminations par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) sur la période 2004-2007 est estimée entre 7000 et 8000 par an (Intervalle de confiance (IC) 95 % : 5000-9300 cas) soit un taux d'incidence de 17 à 19 pour 100 000 personnes-années. Le taux d'incidence pour les années 2009-2010 est estimé à 11 pour 100 000 en France [1]. Le nombre de personnes qui ont été contaminées dans le monde en 2012 est de 2.3 millions (IC 95 % 1.9 million – 2.7 million) (2.5 millions en 2010) selon les dernières données de l'ONUSIDA [2]. Les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et ne connaissant pas leur statut sérologique sont significativement plus susceptibles de s'infecter [3]. L'épidémie est majeure et en constante augmentation chez les Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes (HSH) au Nord comme au Sud [4].

En primo-infection, les charges virales plasmatiques et génitales élevées [5] augmentent le risque de transmission, responsable selon les études de 8 à 19 % des nouvelles infections, tant chez les hétérosexuels que chez les homosexuels [6-9]. Le risque de transmission est 26 fois plus élevé qu'en phase chronique [10]. De plus des études phylogénétiques virales récentes dans des cohortes de patients en primo-infection retrouvent les mêmes clusters de transmission pour 30 à 50 % des patients [11-14]. La phase de primo-infection VIH est brève mais efficace en matière de transmission virale. L'augmentation de l'activité de dépistage du VIH en France reste modérée (+5 %) entre 2010 et 2012, malgré les recommandations d'élargissement du dépistage publiées fin 2010 et la situation épidémiologique chez les HSH en Ile de France est très préoccupante. Aussi, le traitement en primo-infection est un des facteurs qui permettra de mieux contrôler l'épidémie majeure qui sévit notamment en Ile de France [15]. Les premières semaines qui suivent l'infection VIH-1 sont extrêmement dynamiques. Elles sont associées à une atteinte rapide avec dégénérescence des cellules immunitaires et à l'établissement de la latence virale [16]. La détection de plus en plus précoce des patients en phase de primo-infection liés aux progrès récents des tests diagnostiques, des campagnes d'informations et une meilleure performance clinique, ont permis aux chercheurs l'accès à des échantillons provenant de patients infectés plus tôt et en plus grand nombre qu'auparavant [17]. Bien que des progrès considérables aient été réalisés

dans la compréhension de la transmission du VIH, dans la physiopathologie en primo-infection, d'autres études sont nécessaires pour développer des stratégies de prévention et de traitements optimaux pour un bénéfice individuel et collectif.

1. Physiopathologie de la primo-infection

1.1. Aspects virologiques

1.1.1 Acquisition du VIH

Plus de 80 % des infections par le VIH-1 surviennent après une exposition sexuelle via les voies génitales ou la muqueuse rectale ou orale [2, 18]. La probabilité de transmission par rencontre coïtale, déterminée chez des couples sérodiscordants, les couples hétérosexuels, est cependant peu élevée (0,001 à 0,008) [7] et est réduite chez les hommes circoncis [19]. Seules quelques études chez le singe et *in vitro* sur des cellules humaines ont permis d'étudier à ce jour les premiers mécanismes de transmission du virus [20-23]. Aussi l'infection chez le *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) peut être transmise sous deux états [24], soit sous forme de particules virales ou soit du virus lié aux cellules mais reste discuté chez l'homme [25]. En outre, le mécanisme par lequel le VIH-1 traverse l'épithélium vaginal n'est pas clair; la diffusion du VIH-1 à travers la muqueuse vaginale est ralentie par le mucus cervico-vaginal [26, 27], aussi la transmission est plus fréquente si la muqueuse génitale est lésée par un traumatisme physique ou l'existence de l'infection génitale [23, 28-30]. Il est possible que le virus qui atteint l'épithélium muqueux traverse cette barrière par transcytose ou en prenant contact directement avec les dendrites des cellules dendritiques intra-épithéliales. Les cellules dendritiques exprimant les molécules CD4, *C-C Chemokine Receptor type 5* (CCR5) et *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin* (DC-SIGN), une lectine de type C qui permet de piéger le virus intact sont très susceptibles à l'infection [31].

Au cours de la primo-infection, le virus présente un tropisme accru pour les cellules exprimant le corécepteur CCR5+ [32], il va infecter initialement quelques cellules présentes dans la lamina propria du vagin ou du rectum [28], à savoir les lymphocytes T CD4 de types transitionnels/Effecteurs mémoires quiescents ou subactivés [33] exprimant des niveaux suffisants du corécepteur CCR5 [34] (figure 1), les macrophages et les cellules dendritiques [35]. Les virus de tropisme X4 peuvent infecter les cellules T CD4 quiescentes qu'elles soient naïves ou mémoires [36]. Des études récentes ont décrit une fréquence variable (3,2 % - 17,5 %) de virus plasmatiques à tropisme mixte X4/R5 chez des patients récemment infectés, aux USA et en Espagne [37-39]. En France, sur un échantillon de 390 patients en primo-infection

recrutés dans la cohorte PRIMO ANRS CO06 de 1996 à 2007, une proportion assez élevée de virus X4/R5 (15,9 %) a été retrouvée [40]. Les *Dendritic Cells* (DCs) vont contribuer au recrutement de lymphocytes T CD4 au site de l'infection par la sécrétion de *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 β [41], favorisant la réplication virale à cette phase de transmission. Les cellules T CD4 tissulaires sont les cellules majoritairement infectées durant cette phase [42]. Ces cellules s'organiseront en agrégats dispersés pour une meilleure amplification de l'infection [35].

La capacité du VIH-1 à infecter une cellule dépend de l'état d'activation de la cellule, du niveau d'expression des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1, et du tropisme de la souche virale.

1.1.2. Cycle du virus dans la cellule

La durée moyenne d'un cycle de réplication virale est estimée à 2 jours dans le pool de T CD4 à réplication active [43] (Figure 1).

La première étape est la fixation de la particule virale par la Gp120 virale aux récepteurs CD4 et co-récepteurs CCR5 et *Chemokine Receptor type 4* (CXCR4) à la surface des cellules. L'attachement engendre une modification de la conformation de la Gp41 qui permet alors la fusion des membranes cellulaires. Les acides ribonucléiques (ARN) génomiques du VIH-1 pénètrent ensuite dans le cytoplasme dans le cadre d'un complexe de nucléoprotéine [44].

Le génome ARN viral est rétrotranscrit en un double brin d'acide désoxyribonucléique (ds-ADN), qui possède à ses extrémités des séquences répétées terminales appelés «Long Terminal Repeat» (LTR) [45]. La molécule d'ADN viral linéaire est une partie du complexe de pré-intégration qui pénètre dans le noyau par les pores nucléaires (NPC) lorsque le niveau d'adenosine-5'-triphosphate (ATP) est suffisant, qui peut rester dans le cytosol où il est très instable et existe à l'état latent pré-intégration transitoire.

Dans le noyau, l'ADN viral non intégré se trouve sous deux formes, linéaires et circulaires. Les formes circulaires non intégrées de l'ADN viral ont soit un, soit deux LTR, sont des sous-produits du processus d'intégration, et se trouvent exclusivement dans le noyau. Ceux sont des marqueurs d'infection récente selon leur durée de vie dans la cellule qui est controversée [46, 47]. L'ADN viral linéaire est intégré dans le génome de la cellule hôte le plus souvent au niveau introns de gènes activement transcrits [48], sous forme d'ADN proviral. L'intégrase virale en présence d'un cofacteur cellulaire essentiel : the human lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75), permet la formation de jonctions entre les

séquences répétées «Long terminal Repeat» (LTR) de l'ADN-VIH et de l'ADN cellulaire [49, 50]. L'ADN proviral est la forme la plus stable de l'ADN-VIH [51] qui demeure indéfiniment dans le génome de la cellule hôte et qui sert de matrice pour la transcription virale [52].

La transcription virale est dépendante de l'état d'activation des cellules. L'accès des facteurs de transcription virale au site d'initiation de la transcription est limité dans les cellules quiescentes par la structure compactée de la chromatine. Lors de l'activation, le génome viral est transcrit par l'ARN polymérase II avec l'interaction synergique de facteurs d'activation cellulaires facteur nucléaire-kB (NF-kB), le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) et une protéine de spécificité (SP1). Ces facteurs permettent en effet le remodelage de deux nucléosomes nuc-0 et nuc-1 se trouvant dans la région 5'LTR, par altération de leur structure de façon non covalente et dépendante de l'ATP (hélicase), par modifications épigénétiques covalentes notamment par acétylation des histones, méthylation de l'ADN favorisant une structure ouverte de la chromatine [53] permettant l'expression des gènes viraux [54]. Les phases d'élongation sont dépendantes du rôle clef de la protéine *Trans-Activator of Transcription* (Tat) qui régule la transcription, l'épissage et le transport cytosolique d'une partie des ARNm viraux, qui sont traduits en protéines virales de régulation (Tat, *Negative regulator factor* (Nef), *Regulator of Expression of Virion Proteins* (Rev)) et structurales (précurseurs polyprotéiques, de la capsid et protéines associées à l'ARN (Gag), d'enzymes virales (reverse transcriptase, intégrase, Polymérase) Pol, glycoprotéines d'enveloppe (Env) et protéines matures *Virion Infectivity Factor* (Vif), *Viral Protein R* (Vpr), *Viral Protein U* (Vpu)). Tat permet le recrutement de facteurs facilitant l'élongation tels que les histones acétyltransférases et le complexe *positive transcription elongation factor b* (p-TEFB) [55, 56]. Une mutation ou l'absence de protéine Tat engendre l'absence de réplication virale [57]. Les nouveaux virions sont assemblés et vont poursuivre leur maturation avec notamment l'action de la protéase virale qui va cliver les polyprotéines d'enveloppe Gag et Gag-Pol en protéines matures [58, 59]. Le cycle viral est représenté figure 1.

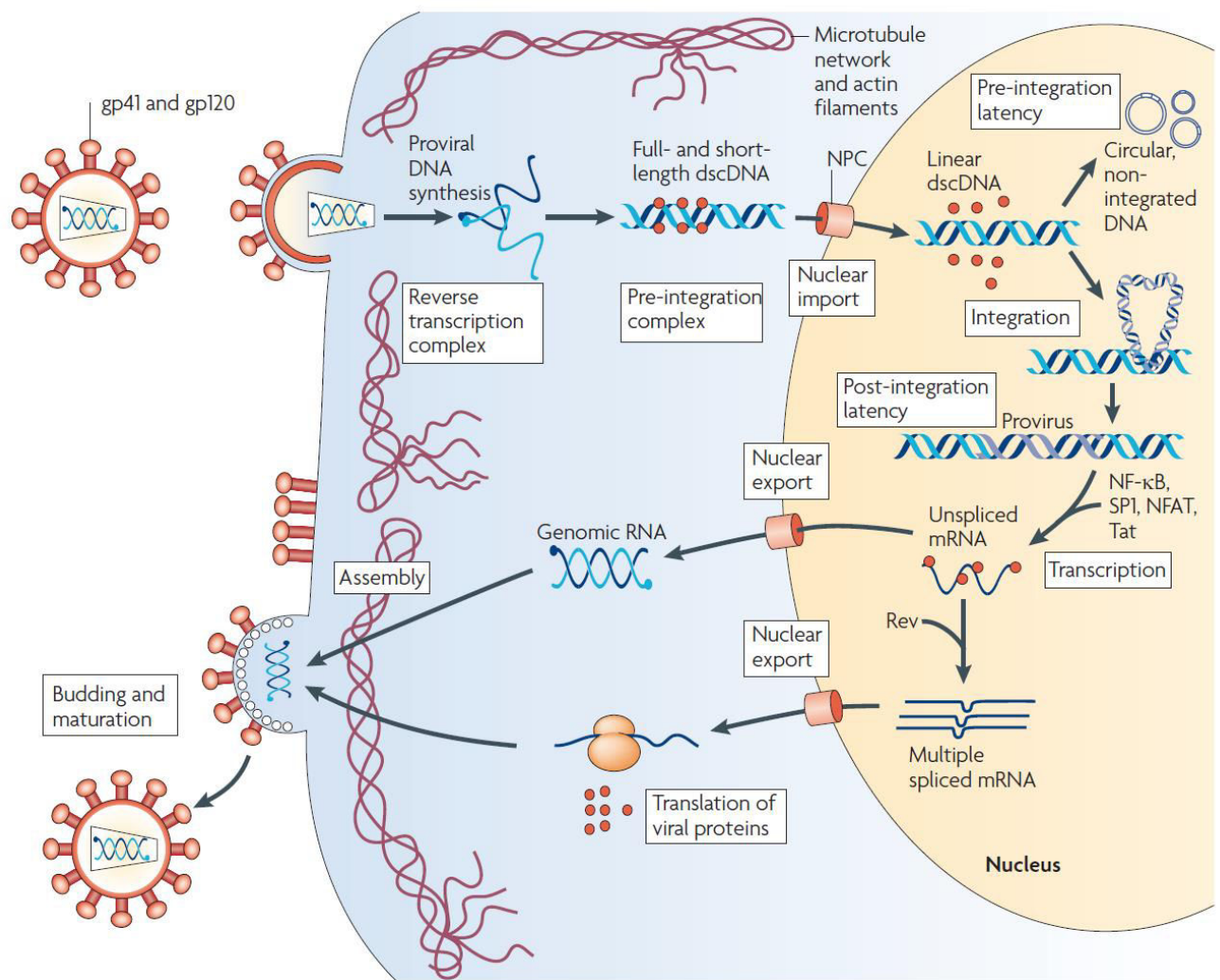


Figure 1 : Principales étapes de la réplication virale, adapté d'après Coiras *et al* [59].

1.1.3. Invasion virale et dissémination dans l'organisme

Après la contamination par voie muqueuse, le VIH va se disséminer dans différents organes contenant des cellules cibles. Cette phase dite d'éclipse dure de 7 à 21 jours et le virus n'est pas encore détectable dans le plasma sanguin [60]. La dissémination virale est effectuée via les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les cellules épithéliales, dans lesquelles sont accumulées des vacuoles intracytoplasmiques contenant les particules virales infectieuses [61]. Ces cellules vont permettre le transfert aux lymphocytes T CD4 cibles grâce à des synapses virologiques puis vont migrer vers les ganglions proximaux [62, 63]. Les DCs infectés sont retrouvés dans les 24 heures dans les ganglions lymphatiques des sites de drainage [64].

Les principaux organes infectés sont les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques (ganglions, rate, tissus lymphoïdes des muqueuses intestinales et pulmonaires) qui possèdent 98 % des lymphocytes T CD4. Les clones plasmatiques détectés infectent avec une grande efficacité les lymphocytes T CD4 exprimant le récepteur d'attachement CD4 et le corécepteur CCR5 et CXCR4 ainsi que les autres cellules lymphoïdes et myéloïdes [26]. Les ganglions sont le lieu de rencontre des antigènes et des cellules du système immunitaire pour l'établissement des réponses immunes. Les études menées chez l'homme et chez le singe ont montré que l'activation des lymphocytes T CD4 infectés dans les ganglions conduit à une amplification majeure de la production virale [65]. L'hyperplasie folliculaire et l'activation immune intense conduit à un « burn out » du tissu lymphocytaire folliculaire dans les quelques études menées chez l'homme [65-68].

Les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et les organes lieu de résidence des différents cellules immunitaires (système nerveux central, tractus génitaux, foie) sont également rapidement infectés [69, 70]. La dissémination du VIH aux organes lymphoïdes secondaires est rapide [71] et associée à une réplication virale exponentielle qui atteint un pic de production en deux à quatre semaines [68, 70]. A cette phase 30 à 60 % des lymphocytes T CD4 sont infectés [66] avec une forte déplétion de leur nombre dans le sang et les tissus, particulièrement dans le tissu lymphoïde digestif, *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT) [72]. La virémie se stabilisera progressivement après quelques semaines à des niveaux variables chez les patients en fonction de l'efficacité de la réponse immunitaire au long cours. Cela est représenté par le «set-point viral» qui survient le plus souvent 14 semaines après la

contamination [73, 74]. Il se constitue alors très rapidement un réservoir viral latent après intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte [16] (Figure 2).

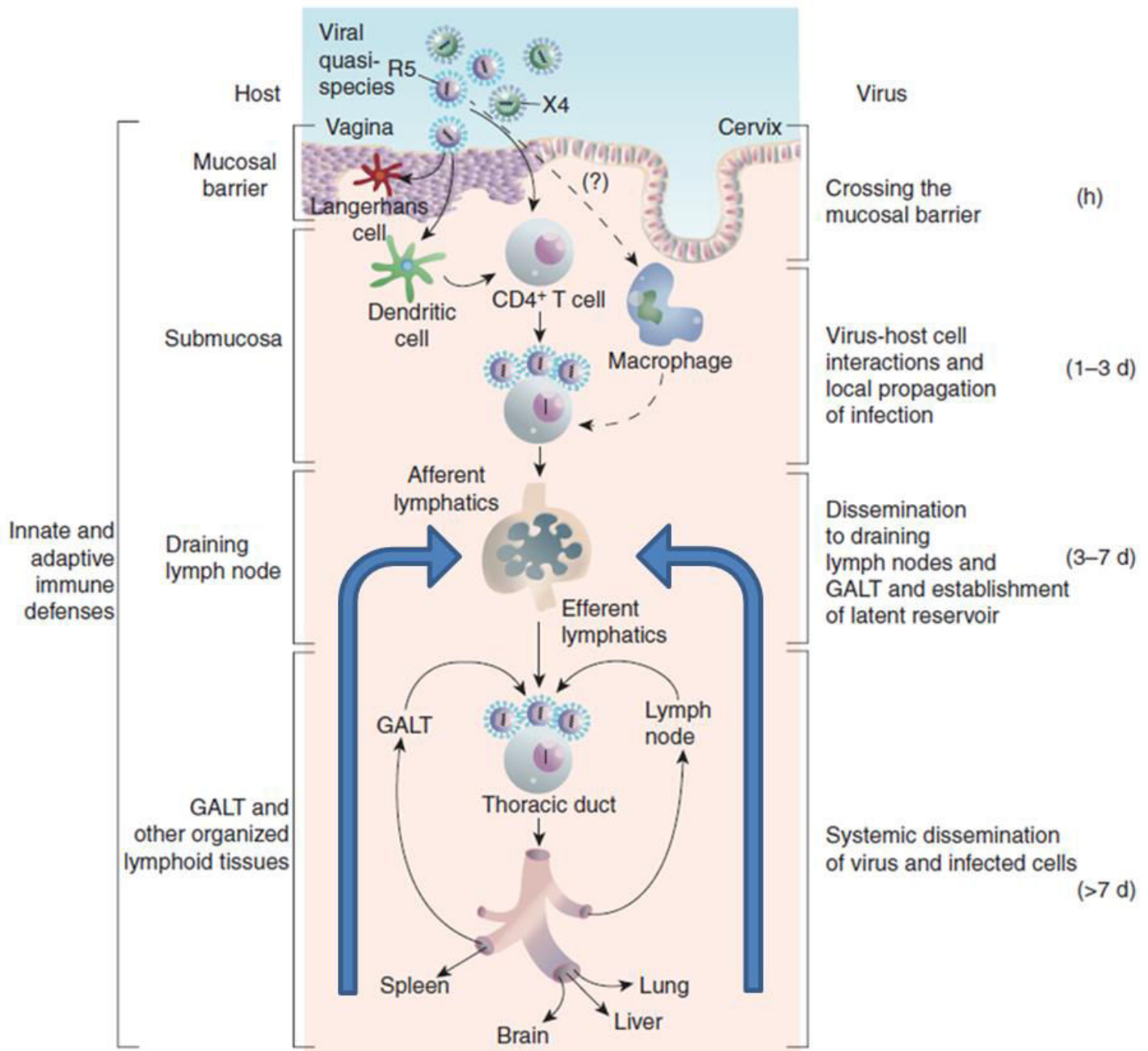


Figure 2 : Modèle d'infection et de dissémination de l'infection par le VIH, adaptée de SHAW *et al.*[75].

1.1.4. Diversité virale en primo-infection

La diversité génétique est une des caractéristiques majeures du VIH-1 dont quatre groupes ont été identifiés le groupe M (majoritaire) et les groupes O, N et P. Le groupe M représente 90 % des infections dans le monde au sein duquel le sous-type B représente 15 % des infections VIH-1. La majorité des virus retrouvés en primo-infection en France était de sous-type B (75 %) et avec ces dernières années une augmentation de la prévalence de sous-types non B qui est passée de 15 % en 1996 à 33 % en 2010-2012 dont 54.7 % de type CRF02_AG [76] . La proportion de virus transmis, résistants à au moins un antirétroviral est estimée à 10,9 %. La résistance concerne essentiellement les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) (5 %), les Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI) (4 %) puis la classe des antiprotéases (2,2 %). Les virus multirésistants sont beaucoup plus rares, moins de 2 % [77].

Les études de phylogénie analysant des quasi-espèces virales plasmatiques lors de la phase de primo-infection VIH rapportent des résultats variables suivant les études. En effet la population virale en primo-infection étudiée au niveau sanguin a été décrite comme étant hétérogènes avec plusieurs virus transmis ou émergents au décours de la primo-infection, chez 20 %, 40 %, 60 % des patients en cas de contamination hétérosexuelle, homosexuelle et intraveineuse respectivement [26, 78-81]. Le plus souvent, la transmission est homogène avec un seul virion, compétent et aboutissant à une infection productive [26], soit seul transmis soit issu d'un goulot d'étranglement au décours de la primo-infection [82-85]. Elle peut être hétérogène soit par la transmission de plusieurs virions ou émergents au décours de la primo-infection [26, 86]. L'homogénéité fréquente des clones identifiés est en faveur d'un seul virus infectant les T CD4 de la muqueuse. L'étude des mutations de résistance du VIH aux antirétroviraux chez 44 patients en primo-infection, retrouve les mêmes variants circulant dans le plasma sur l'ARN-VIH 1 plasmatique que ceux dans les *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) (évalué par génotypage sur l'ADN-VIH 1 total), traduisant d'emblée un archivage des souches acquises dans le réservoir [87]. L'émergence d'un seul cluster viral plasmatique est probablement conditionnée par la fréquence élevée d'erreur de transcription inverse, la capacité répliquative du virus transmis et son tropisme. L'effet des protéines antivirales APOBEC 3G et 3F (*APOLipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide*) aboutissant à de nombreux virus défectifs [88] pourrait aussi intervenir dans

cette sélection clonale. Cependant dans la plupart de ces études il n'y avait pas de comparaison avec les quasi-espèces du partenaire «source».

L'étude des clones viraux à partir de l'ADN-VIH dans les PBMC et l'ARN-VIH plasmatique comparés entre 8 receveurs et 8 donneurs retrouve la transmission d'un seul virion transmis, minoritaire chez chaque donneur, [89] en faveur de la transmission d'un virus ancestral devenu minoritaire [90].

Néanmoins, l'étude phylogénétique des clones viraux à partir de l'ADN-VIH total dans les PBMC les cellules de biopsies rectales et l'ARN-VIH plasmatique sur sept patients non traités dont deux en primo-infection a mis en évidence une plus grande diversité virale des variants dans le rectum que dans le sang reflétant une «cross-infection» entre les deux compartiments [91]. Ces résultats ont été confortés par une étude récente dans les modèles simiens [92]. Cette hétérogénéité peut être expliquée selon les auteurs comme la conséquence d'une réplication virale plus importante dans le tissu lymphoïde digestif ou le degré d'activation immunitaire est plus élevé [93]. Ainsi, l'étude de la diversité génétique dans le réservoir, notamment en primo-infection nécessite de plus amples investigations.

1.2. Aspects immunologiques

La particularité de l'infection par le VIH est la destruction très rapide et massive des cellules T CD4 présentes dans les muqueuses avant qu'une réponse acquise partiellement efficace ne soit mise en place [33, 66]. En effet les réponses adaptatives cellulaires qui apparaissent environ quinze jours après la contamination ne peuvent contenir la dissémination virale [94].

1.2.1. Immunité innée

1.2.1.1 Activation majeure en primo-infection

L'envahissement viral donne lieu en primo-infection VIH à une activation immunitaire intense et délétère des lymphocytes B, T spécifiques et non spécifiques du VIH [95] et NK [96] dont l'origine n'est pas encore clairement définie, mais dont le niveau est prédictif de l'évolution de la maladie [97-101]. Cette hyper activation immunitaire est responsable d'une apoptose précoce et massive des lymphocytes B et T CD4 [102]. Le rôle de cette activation est très certainement majeur, car chez les singes de type sooty-mangabey qui ne progresse pas

vers le stade Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise (SIDA), elle n'est pas observée en phase chronique [103].

Le reflet de cette activation en primo-infection est une tempête cytokinique massive qui coïncide avec une vague de sécrétion de protéines inflammatoires [101]. Les sources cellulaires des cytokines et de chimiokines au cours de la primo-infection VIH-1 n'ont pas toutes été formellement identifiées mais incluent les T CD4 infectés CCR5 +, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK, les cellules NKT et ensuite des cellules T CD8 spécifiques [104-106]. La complexité du rôle des cytokines en primo-infection VIH ou SIV est partiellement comprise et les bénéfices et rôles de chacune, encore très débattus [101]. Certaines ont un rôle d'inhibition de la réplication virale comme les interférons (INF) de type 1 [107]. L'interleukine 2 (IL2) aurait un rôle clef, car il apparaît actuellement que la fonction essentielle de cellules T efficaces est la capacité à s'expander qui est dépendante de la production d'IL2 [104, 108] principalement pour les cellules mémoires T centrales et effectrices [108, 109], capacité d'expansion s'accompagnant de propriétés effectrices [110]. Une cytokine, *Interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) suscite beaucoup d'intérêt actuellement car son niveau en primo-infection est prédictif de la rapidité d'évolution de l'infection [111]. IP-10 est sécrétée par les monocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes en réponse à l'Interféron I et II [112, 113]. Elle possède une activité chimioattractive pour les lymphocytes T, les cellules *Natural Killer* (NK) et les monocytes [114]. Ainsi, IP-10 permettrait l'amplification de la réponse anti-VIH dans les organes lymphoïdes [115, 116]. La cinétique de croissance et de décroissance du niveau des chimiokines et des cytokines plasmatiques suit celles de la réplication virale [117, 118]. Ce niveau de réponse aussi élevée n'est pas retrouvée dans les autres infections virales (VHB, VHC) pour lesquelles la moindre intensité de la réponse cytokinique peut être suffisant pour une clairance virale [118]. Ceci suggérant qu'une réponse cytokinique majeure n'est pas un prérequis pour la clairance virale [119]. De plus les hauts niveaux de réponses cytokiniques sont retrouvés dans les formes graves d'infection aigüe avec les virus de la grippe [120] mettant aussi en exergue leur rôle potentiellement délétère. Aussi les cytokines les plus communes IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 (*gamma chain cytokines*) jouent un rôle majeur dans la pathogénèse de l'infection par le VIH en régulant la production virale aussi bien que les réponses innées et adaptatives [121] (Figure 3).

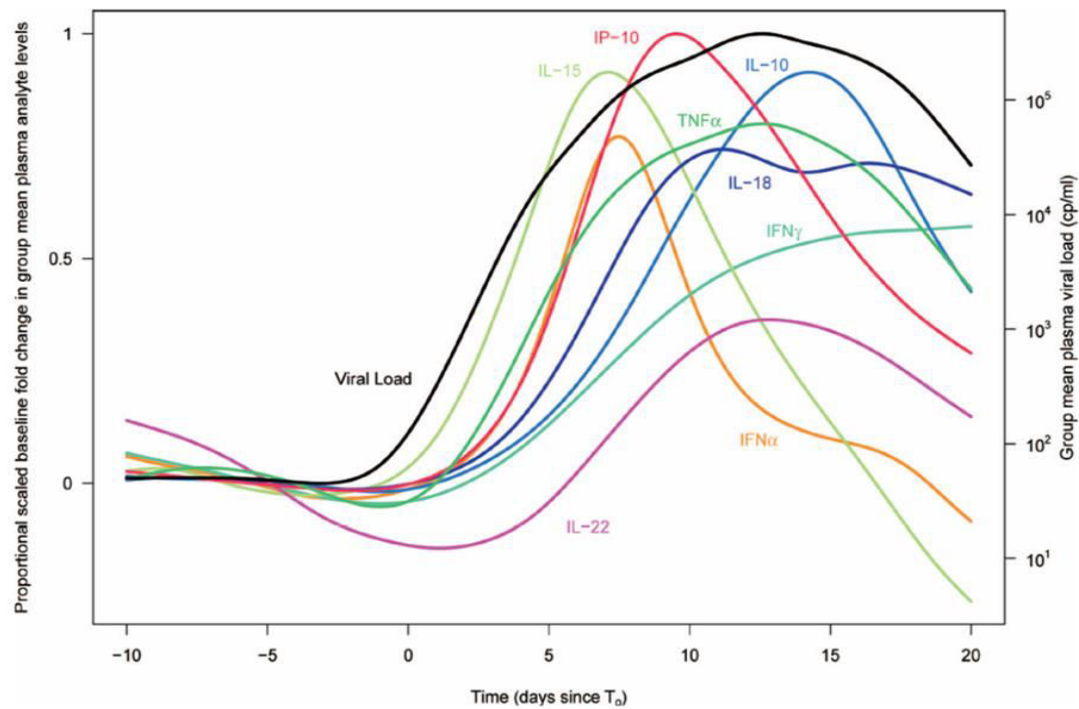


Figure 3 : Cinétique de production des cytokines en primo-infection, d'après Stacey, R *et al.* [118].

1.2.1.2. Réponses cellulaires

Un des premiers mécanismes de défense de l'immunité qui intervient dans les minutes et les jours suivant l'infection par le VIH est la réponse des acteurs de l'immunité innée. Leur rôle dans la transmission et la dissémination virale est essentiel.

L'infection par le VIH-1 est associée à des perturbations majeures de l'immunité innée, qu'il s'agisse des cellules NK, des T gamma delta, des cellules dendritiques et des monocytes [122, 123]. Les cellules T $\gamma\delta 2$ ont un phénotype modifié et une fonction altérée chez des patients infectés par le VIH-1 [124]. Le rôle « protecteur » des PDC contre l'infection VIH a été démontré par leur capacité à produire les interférons de type 1 en réponse à l'infection virale [125, 126]. Les bases de l'interaction VIH-1 et PDC sont encore mal comprises. Le nombre de macrophages circulants diminue particulièrement au moment de la primo-infection [127], le nombre des PDC est plus important chez les patients contrôlant le VIH-1 [125]. Des altérations des populations de cellules dendritiques et de monocytes circulants sont observées tant en terme quantitatif que qualitatif (capacité à être stimulées via les TLR) [125, 128] [129]. Ainsi le nombre de *Plasmacytoides Dendritic Cells* (pDCs) diminue particulièrement en raison de leur migration dans les organes lymphoïdes où ils se concentrent en primo-

infection et de leur lyse massive consécutive à un haut niveau d'activation [62, 126]. Le rôle de cellule présentatrice d'antigène (cpag) des cellules dendritiques aux lymphocytes après liaison aux virus par la lectine DC-sign [130] récepteur de la gp120 virale [131], est primordial dans l'établissement de la réponse adaptative par la présentation des antigènes aux lymphocytes [132, 133]. Les pDCs modulent la réaction immunitaire spécifique via la production d'INF γ , la production d'indoleamine 2-3, dioxygénase (DIO) qui induit la différenciation T CD4 en TReg inhibant les réponses spécifiques anti-VIH [134-136].

Parallèlement les cellules NK (*Natural Killer*) et NKT (*Natural Killer T*) comme dans toute infection virale, sont activées [137, 138]. Ces cellules peuvent réduire la réplication virale par cytolysse des cellules infectées [138, 139] contribuant aussi à la déplétion en T CD4. Elles peuvent également par production de cytokines et chimiokines (MIP1a, MIP1b et *Regulated upon Activation Normal T cell expressed and Secreted* (RANTES)), ligand naturels du CCR5 bloquant l'entrée du virus dans les T CD4, [140] inhiber sa réplication [123, 141]. Les NK interagissent également avec les macrophages et influencent la réponse T par présentation de l'antigène aux lymphocytes et sont un relais pour activer l'immunité acquise [142]. Cependant, en primo-infection VIH, l'activation et les fonctions NK sont perturbées [143]. Elles présentent une capacité diminuée à tuer les cellules T CD4 infectées liées aux altérations de l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK et de la présence de populations de cellules NK non fonctionnelles (CD56-CD16+) [144, 145] [142, 146]. De même les capacités des cellules NK à inhiber la réplication du VIH-1 sont diminuées chez les patients virémiques [147, 148].

Ces altérations se traduisent par une inhibition de la capacité des NK à tuer les cellules dendritiques immatures [149]. Dans le cadre de l'infection aiguë, le nombre des cellules NK (CD3- CD56 dim.) à activité cytotoxique augmente [138, 150] et représentent la population dominante de NK retrouvée dans le sang. De plus, en primo-infection, leurs capacités de dégranulation et de production d'interféron γ sont augmentées [150, 151].

L'activité importante des fonctions NK est d'ailleurs associée au contrôle de l'infection virale chez des sujets exposés au virus mais non infectés [152]. Certaines sous populations de NK exprimant la molécule CD85j pourrait participer aux fonctions protectrices des NK chez les patients [153, 154] et certains allèles du *Human Leukocyte Antigen* (HLA) de classe 1 en particulier HLA-57-01 et HLA-55-03 sont associés à un meilleur contrôle du virus [155]. De façon intéressante, en cas d'infection ces allèles se lient à *Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1* (KIR3DL1) qui est un des récepteurs inhibiteurs de l'activité des NK bloquant

son rôle d'inhibiteur de l'activité des NK, permettrait aux NK exprimant KIR3DL1 de lyser les cellules cibles [155]. Les altérations des cellules NK peuvent être reproduites en partie *in vitro* par co-culture en présence de la protéine gp120 [156]. Le récepteur impliqué dans cette fixation serait une forme activée de l'intégrine alpha4 beta7 retrouvée également chez les T CD4 et CD8 [157].

L'ensemble de ces données indique un rôle important des NK dans le contrôle initial de la réplication virale dès la primo-infection. Ces perturbations pourraient conduire à l'immunopathologie associée à l'infection par le VIH via éventuellement la dysrégulation de la production d'IFN γ [105]. Au décours de l'infection, le nombre de NK va diminuer progressivement limitant les capacités de réponses de l'organisme à l'infection [158].

1.2.2. Réponses lymphocytaires spécifiques

L'immunité acquise ou spécifique anti-VIH intervient plus tardivement car elle implique une cascade d'activation des cellules capables de reconnaître spécifiquement les antigènes viraux. Il est généralement admis que les réponses T spécifiques CD4 et CD8 participent au contrôle de la réplication virale, notamment pendant la phase aigüe de l'infection [73, 105, 159].

1.2.2.1. Les lymphocytes T CD8 spécifiques anti-VIH

Quelques études ont évalué la réponse T CD8 anti-VIH [160] en stade très précoce avant l'apparition des anticorps. Cette réponse se met en place au moment du pic viral ou dans la majorité des cas un seul cluster viral est retrouvé [26, 161]. Les lymphocytes T CD8 sont directement responsables du contrôle initial de virémie en primo-infection VIH en reconnaissant les épitopes présents au début de l'infection (Env, Nef, Gag p24 Pol) [162]. Cette activité suppressive s'exerce par l'**élimination des T CD4** infectés, activité d'ailleurs très conservées chez les patients *Human Immunodeficiency Virus (HIV) Controllers* [163]. Les lymphocytes T CD8 interviennent également en inhibant la réplication virale par la production de molécules dites suppressives du groupe des β -chimiokines (RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β) [141]. Cette réponse naturellement suscitée s'épuise progressivement, en raison de l'émergence de nombreux mutants [73, 164, 165], de l'activation chronique et de la mauvaise réponse TH1 [73, 166, 167].

La réponse à des épitopes plus conservés a probablement un impact important dans le contrôle au long cours de l'infection. En effet les patients qui contrôlent l'infection à long terme présentent un phénotype HLA-B*27, HLA-B*5701, HLA-B*5703, HLA-B*5801 avec des T CD8 qui reconnaissent des zones moins variables du virus (Gag) [168, 169].

1.2.2.2. Les lymphocytes T CD4 spécifiques anti-VIH

La réponse T CD4 en particulier dans sa fonction helper (TH1) est primordial dans le contrôle des infections virales [161, 170] et est très altérée lors de la primo-infection VIH par la déplétion massive des T CD4 [66]. Aussi plusieurs épitopes (protéines de capsid du virus, p24, p17, p41, gp 120) liés à la réponse spécifique T CD4 ont été identifiés [171]. Les lymphocytes T CD4 activés (T CD4 A) produisent alors des cytokines antivirales (INF γ). Un contrôle de la réplication virale peut s'observer pendant de longues années chez un petit nombre d'individus (HIV Contrôleurs [HIC], 0.5 % des patients infectés) qui possèdent des réponses spécifiques T CD4 et T CD8 quantitativement et qualitativement importantes chez ces patients, ce qui suggère un effet bénéfique de ces réponses participant sans doute à ce contrôle naturel de l'infection [109, 163, 172]. Cependant en primo-infection, la présence d'un niveau de cytokines plasmatiques élevé engendre une prolifération anarchique des T CD4 empêchant une compensation efficace par les cellules mémoires en raison de leur déplétion importante [173-175]. Cette réponse va très rapidement diminuer chez la majorité des patients [176] au regard de la chute rapide du nombre de lymphocytes T CD4 [72], le plus souvent inférieur à la normale ($<500/\text{mm}^3$) [177]. Elle décline aussi du fait d'une anergie rapide qui se traduit par une surexpression du facteur de régulation négatif de l'activation PD-1 [178], facteur dont le blocage favoriserait le meilleur contrôle de la réplication virale [179]. La perte importante de T CD4 helper, nécessaires aux réponses T CD8 associée et l'activation généralisée sont responsables du défaut de fonctionnalité des T CD8 [166, 167].

Les réponses T CD4 et T CD8 spécifiques sont faibles en primo-infection quantitativement et qualitativement [180, 181]. Certaines réponses sont corrélées positivement à la virémie et peuvent également s'observer à des stades avancés de la maladie, ces éléments suggérant leur faible capacité à contrôler la réplication virale [182, 183]. Il apparaît que la fonction essentielle des cellules T est leur capacité à s'expandre et que le contrôle de la charge virale serait plus associé à la prolifération des cellules mémoires qu'à la production d'IFN- γ [184]. L'ensemble de ces réponses aboutissent à un contrôle partiel de la réplication virale

avec un état d'équilibre immuno-virologique, représenté par le set-point virologique [32, 185].

Néanmoins, la virémie persistante chez la plupart des patients non traités a pour conséquence une destruction continue et progressive des T CD4 pour atteindre, en moyenne en dix ans, une déplétion importante définissant le stade SIDA [186].

1.2.2.3. Les Lymphocytes B

Cette surproduction de cytokines va entraîner une suractivation du répertoire lymphocytaire B avec une diminution du nombre de lymphocytes B en primo-infection VIH [137, 187, 188]. Les perturbations fonctionnelles des lymphocytes B se traduisent alors par une hypergamma-globulinémie associée à une activation polyclonale anti-VIH [189, 190] et la diminution des réponses polyclonales B aux immunogènes non VIH [191, 192].

La première réponse anticorps anti-gp41 apparaît à J13 de l'infection suivie à J14 des anticorps antigp120 et à trois semaines de la sécrétion d'IgA muqueuses qui ne sont pas neutralisantes [193, 194]. Plus tardivement, à 12 semaines apparaît la réponse anticorps neutralisante qui ciblera uniquement les protéines d'enveloppes du virus transmis, expliquant son inefficacité rapide sur les mutants émergents [193, 195].

1.2.2.4. Conséquences de la déplétion lymphocytaire T CD4 dans le tissu lymphoïde digestif (GALT) de la muqueuse digestive

La muqueuse intestinale, par ses caractéristiques anatomiques et physiologiques, est une barrière immunologique et physique contre l'envahissement par les micro-organismes du tube digestif. Dans les premières semaines de l'infection, il existe une déplétion lymphocytaire T CD4 modérée qui contraste avec la perte massive et rapide des T CD4 appartenant au GALT tant chez le singe [33, 66, 196, 197] que chez l'homme [198, 199]. Cela est la conséquence de l'expression massive de CCR5 sur les lymphocytes T CD4 siégeant dans la muqueuse du tube digestif et (9, 11, 13, 66–70) en faisant une cible privilégiée du virus [66, 200–202].

Aussi, la chute des T CD4 Th17 [203, 204], cellules qui sont directement ciblées par le VIH [205], amènent à une insuffisance de production des IL-17 et IL-22, cytokines qui interviennent dans les défenses de la muqueuse digestive et pulmonaire [206]. Les marqueurs

de translocation bactérienne ont été étudié chez 27 patients très précocement primo-infection (délai médian post-contamination 42 jours). Les niveaux d'*Intestinal-Fatty acid-binding proteins* (I-FABP), un marqueur des dommages muqueux, étaient semblables au départ à des témoins sains, mais ont augmenté à 6 mois du début de la primo-infection. Il n'y avait aucune diminution de l'anticorps anti-noyau d'endotoxine (EndoCAb) et il n'était pas détecté de peptidoglycane. En outre, les ADNr 16S ont été détectés uniquement en faibles concentrations chez 2 sur 27 patients à l'inclusion et chez une patiente supplémentaire à 6 mois. A contrario, chez des patients en stade chronique de l'infection qui n'ont pas été traités en phase aigüe il a clairement été montré une augmentation des translocations de peptides bactériens induisant une activation immunitaire chronique délétère [72, 207, 208]. Néanmoins, il a été montré chez le singe [209, 210] et chez l'homme [211], au moment de la primo-infection, l'atteinte de l'intégrité de l'épithélium intestinale avec insuffisance fonctionnelle. Au total, les données soutiennent l'hypothèse que l'activation des lymphocytes T et des monocytes en primo-infection récente, n'est pas encore la conséquence de translocations microbiennes, mais est plutôt une des conséquences de la réplication virale [212]. Par ailleurs, la composition du microbiote en primo-infection pourrait influencer la restauration immunitaire, quelques études sont en cours dans ce domaine en plein essor [213]. A terme, l'atteinte majeure des lymphocytes de la muqueuse du tube digestif, associée à un contexte inflammatoire important, se traduira par une entéropathie exsudative avec altération continue et progressive de la muqueuse digestive. L'altération de la barrière muqueuse digestive favorisera les translocations bactériennes favorisant une activation immunitaire chronique [214].

La question du bénéfice d'un traitement initié précocement en primo-infection, sur la préservation au long cours de la muqueuse digestive et ses conséquences sur l'activation chronique restent encore à explorer plus largement.

1.3. Aspects diagnostiques

1.3.1. Principaux aspects cliniques

Les signes cliniques présents chez 50 % des patients en primo-infection sont les conséquences de l'activation et de l'inflammation majeure en primo-infection, ils apparaissent le plus souvent dans les 10 à 15 jours, s'apparentent à un syndrome pseudo-grippal et peuvent persister jusqu'à 10 semaines après la contamination [215]. Néanmoins les tableaux cliniques

sont sujets à des variations individuelles [216] et l'intensité des symptômes est corrélée à la charge ARN-VIH [217], au niveau de l'ADN-VIH dans les PBMC et inversement corrélé au nombre de CD4 [218]. La sévérité des symptômes est corrélée avec la rapidité d'évolution de la pathologie [219]. De hauts niveaux d'ARN-VIH, d'ADN-VIH et un faible nombre de lymphocytes T CD4 en primo-infection sont aussi prédictifs d'une évolution rapide de l'infection [220, 221]. Comme nous l'avons vu, l'intensité de la réaction immunitaire et la multiplication virale s'atténue progressivement et un état d'équilibre immuno-virologique s'installe pour aboutir à une phase biologique et clinique latente. [222] (Tableau1).

Symptômes	Fréquence (%)
Fièvre	>90
Eruption maculo-papuleuse	55-73
Polyadénopathie	57
Pharyngite	40-77
Amaigrissement	19-50
Ulcérations buccales et/ou génitales	30-40
Myalgies, arthralgies	30-60
Troubles digestifs : diarrhée, nausées	33
Céphalées	29-55
Autres signes neurologiques	13
Thrombopénie (<150 000 plaquettes)	30-74
Neutropénie, anémie	35-26
Lymphopénie (<1000)	30
Cytolyse hépatique	23-46

Tableau 1 : Fréquence des anomalies cliniques et biologiques au moment de la primo-infection VIH. D'après le rapport d'expert Français de prise en charge de l'infection par le VIH dirigé par le Pr P. Yeni [223].

1.3.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic de l'infection à VIH est surtout sérologique chez l'enfant (de plus de 18 mois) et chez l'adulte. Il repose sur un algorithme à tests multiples de détection d'anticorps contre les antigènes ou protéines de structure du VIH et est très règlementé par un arrêté du 28 mai 2010 au journal officiel de la république Française, suite aux recommandations de la Haute Autorité de Santé en octobre 2008 [1, 224]

Les tests de dépistage sanguin, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), de détection des anticorps restent la méthode de référence et se basent sur l'utilisation d'une phase solide (billes ou puits de microplaques) sur lesquelles sont adsorbés des antigènes du VIH 1 et 2. Les tests ELISA dits de 4^{ème} génération permettent la détection des anticorps mais aussi de l'antigène P24 permettant un dépistage plus précoce de l'infection de 4 jours en moyenne que les tests ELISA détectant seulement les anticorps. Les biologistes n'utilisent qu'un seul test de type Elisa combinée avec un seuil minimal de détection de l'antigène P24 du VIH-1 de 2 Unités Internationales/mL. Les tests rapides d'orientation et de diagnostic (TROD) sont recommandés dans le dépistage de l'infection VIH « hors les murs ». Il existe différents tests (immuno-chromatographiques, agglutinations) qui peuvent être réalisés sur différents fluides biologiques (plasma, sang total, salive). Cependant, ils sont moins sensibles que les tests ELISA combinés en cas de prélèvement effectué durant la phase de séroconversion et leurs performances sont plus faibles en cas de test réalisés sur un prélèvement salivaire [225]. L'arrêté du 28 Mai 2010 précise que l'utilisation de ces tests quel qu'en soit le résultat doit toujours être confirmé par un dépistage classique (test ELISA). Un intérêt des TROD est de favoriser l'accès au dépistage de l'infection par le rendu rapide du résultat (30 minutes) et son utilisation « hors les murs », vers les populations à risque d'acquisition du VIH [226].

En cas de positivité d'un test ELISA, un test de confirmation est réalisé sur le premier échantillon du patient. Un second prélèvement sanguin de contrôle (ELISA) doit ensuite être réalisé. Les tests combinés peuvent être positifs 15 jours après l'infection grâce à la détection de l'antigène P24 et nécessitera un contrôle sérologique par un test ELISA 15 jours plus tard. Le test de confirmation est soit un immunoblot ou un western-blot (fractionnement préalable des protéines virales, électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide et transfert sur un support type Nylon, nitrocellulose et révélations avec des anticorps spécifiques marqués) plus

spécifique que l'ELISA. Cela permet de détecter des anticorps dirigés contre les différentes protéines constitutives du VIH-1 ou du VIH-2. Un résultat est positif si deux bandes au minimum sont mises en évidence parmi les glycoprotéines d'enveloppe (glycoprotéines, gp 41, gp120, gp160). La présence de ces anticorps anti-protéines d'enveloppe peut être associée ou non à des anticorps dirigés contre les protéines du gène *gag* et/ou *pol*. Si le Western-blot est négatif ou indéterminé des analyses supplémentaires peuvent être réalisées en cas de suspicion de primo-infection.

Aussi l'antigène P24, marqueur de réplication virale, peut être détecté précocement par un test spécifique, deux à trois semaines après la contamination et permet de dépister une primo-infection VIH en cas de western blot négatif ou indéterminé. La quantification de l'ARN-VIH-1 par *Polymérase Chain Reaction* (PCR) en temps réel permet de détecter la présence de virus à partir dès sept à dix jours après la contamination. La haute autorité de santé recommande un dépistage systématique de l'infection à VIH-1 et 2 chez les partenaires sexuels au regard du risque accrue de transmission au cours de la primo-infection VIH [224].

La cinétique d'apparition des anticorps, couplé à la quantification de l'ARN-VIH et/ou de l'ADN-VIH (chez le nouveau-né) [227], de l'antigène P24 ont donc permis de définir des critères biologiques de diagnostic de la primo-infection avec des critères de classification: «stades de Fiebig» [228] (Figure 4).

Le nombre d'anticorps anti-VIH détectés par Western-blot (WB) est corrélé au délai écoulé depuis la contamination : ≤ 1 anticorps pour une durée médiane de 28 jours (extrêmes : 18-49 j), 2 à 4 anticorps pour une durée de 39 jours (16-118 j), ≥ 5 anticorps pour une durée de 63 jours (18-241 j) [218]. Aussi, l'infection aiguë peut être définie par la présence d'un test ELISA VIH-1 négatif ou faiblement positif (3^{ème} ou 4^{ème} génération), avec Western-blot VIH-1 négatif ou incomplet (≤ 1 anticorps) et une charge ARN-VIH positive et/ou antigène p24 positif (stades Fiebig I, II, II). Une infection récente peut être définie par un test ELISA VIH-1 positif avec Western- blot VIH-1 incomplet (≥ 2 et < 5 anticorps avec présence de l'anticorps anti-p24, associé à l'anticorps anti-gp160 ou anti-gp120 ou anti-gp41) et à une charge ARN-VIH positive (stades Fiebig IV, V) [223].

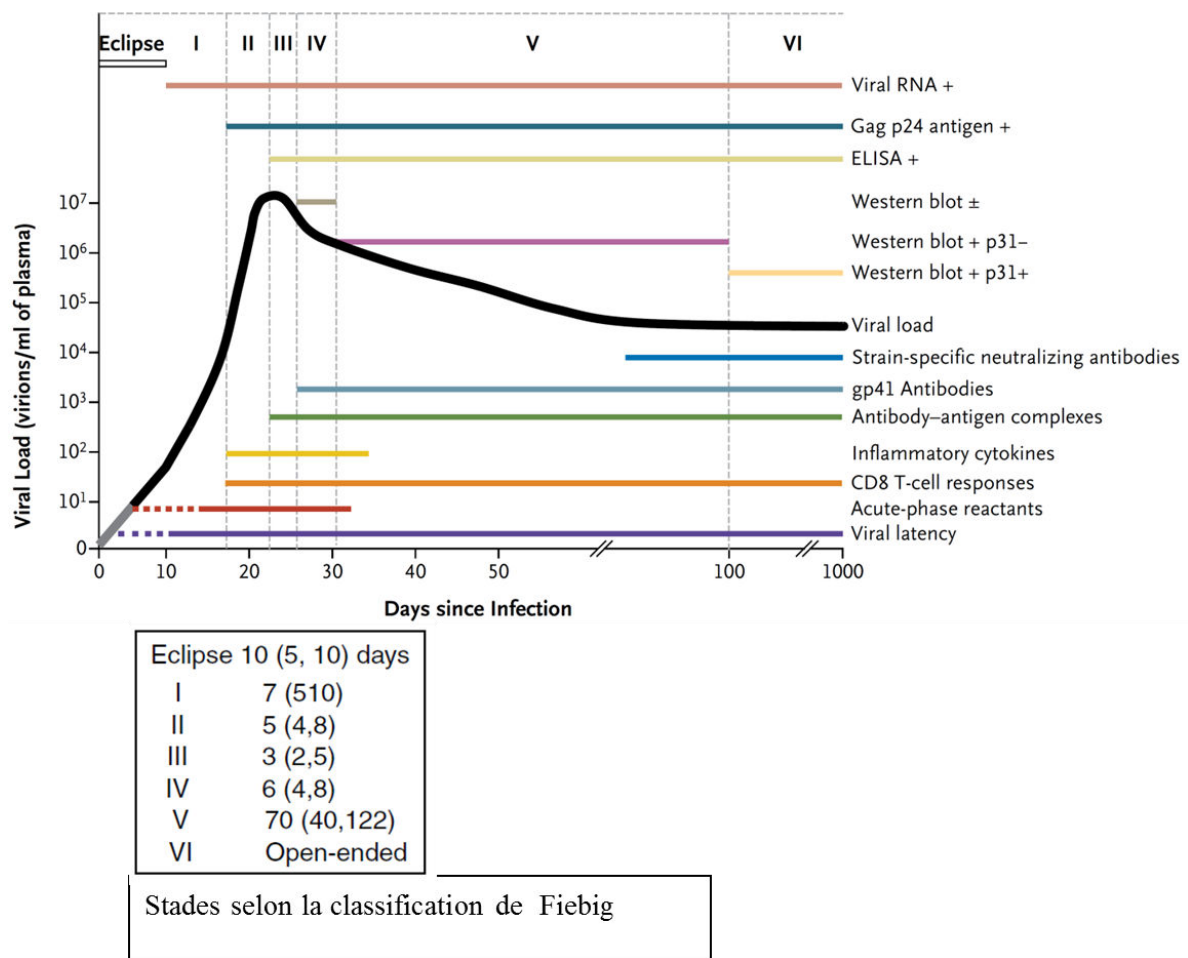


Figure 4 : adaptée de Cohen *et al* [32] : Marqueurs biologiques en histoire naturelle en primo-infection VIH-1.

2. Le Réservoir VIH

Dans les premières phases de l'infection de l'organisme, le virus est essentiellement produit par les lymphocytes T CD4 infectés activés [198]. Cela peut se définir comme un réservoir actif de virus assurant l'amplification virale pour aboutir à l'établissement du réservoir dit quiescent répondant à la définition actuelle du réservoir. Il se définit essentiellement par : des cellules/tissus infectés contenant du génome viral inductible et qui sont capables de produire du virus infectieux avec une cinétique de renouvellement plus lente [229-231] et est impliqué dans la maintenance à long terme du virus dans l'organisme [16, 232]. Le VIH infecte de nombreuses cellules myéloïdes et lymphoïdes conférant suivant leur lieu de résidence et leur capacité de migration, des niveaux de réservoirs variables entre les différents compartiments tissulaires et cellulaires.

2.1. Etablissement et maintien du réservoir quiescent

2.1.1. Infection des sous-populations lymphocytaires T CD4

Les lymphocytes T CD4 mémoires quiescents sont la forme de réservoir du VIH qui a été la plus étudiée. L'infection latente des lymphocytes T CD4 quiescents est expliquée par la physiologie des cellules T. En effet, il existe une relation entre l'état d'activation du lymphocyte T CD4 infecté et sa capacité à produire du virus. En cas d'infection VIH, l'expansion clonale des cellules naïves induite par la rencontre avec un antigène permet en fonction des cytokines produites par le système immunitaire inné d'engager la différenciation fonctionnelle dans les organes lymphoïdes secondaires.

Selon leur état de différenciation, on distingue les sous-populations lymphocytaires suivantes : les naïves (TN), les mémoires centrales (TCM), les mémoires transitionnelles (TMT), les mémoires effectrices (TEM), et les effectrices [36]. Après la phase de contraction clonale, une partie de ces cellules retourneront à un statut mémoire TCM ou TEM [232, 233], propriété qui est utilisée pour le développement des vaccins [234]. Les TCM assurent la réponse immunitaire mémoire au long cours chez l'homme. Les *Stem central memory cell* (TSCM) récemment décrites mais peu étudiées sont minoritaires dans le pool de lymphocytes mémoires. Elles contribuent peu quantitativement au réservoir, mais présentent une longue

durée de vie, ce qui leur confère quand elles sont infectées probablement un rôle important dans le maintien à long terme de ce réservoir VIH [235].

Ces différentes sous-populations lymphocytaires ont une durée de vie, des capacités d'activation et de prolifération différentes avec une expression croissante du CCR5 (Figure 5).

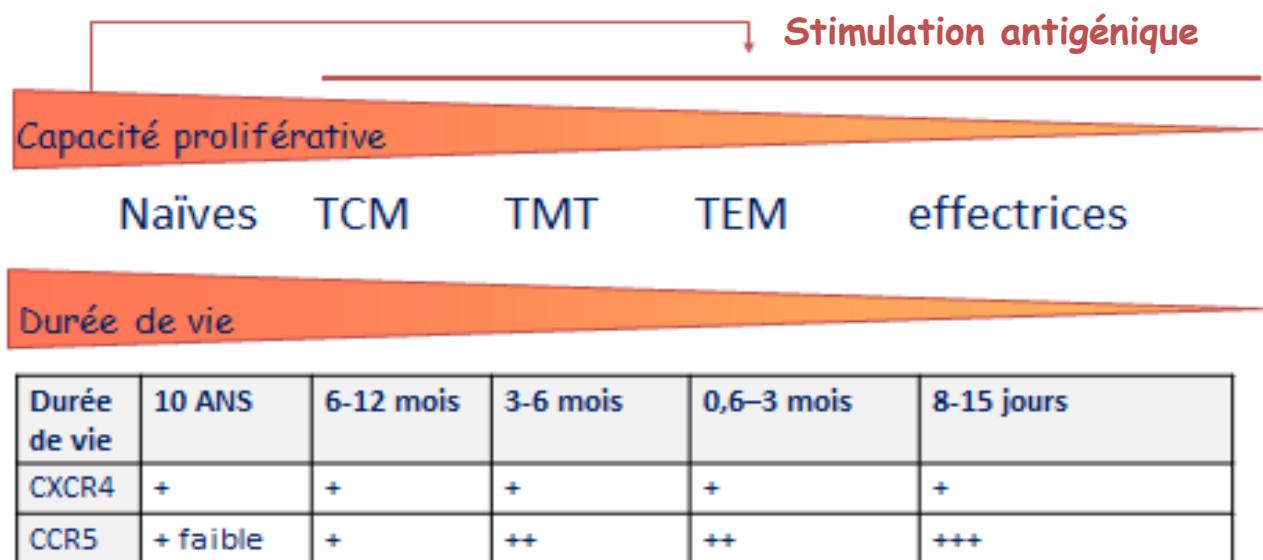


Figure 5 : Capacité proliférative de demi-vie des sous-populations lymphocytaires T CD4 d'après Victor Appay *et al* [236].

L'homéostasie du pool de lymphocytes naïfs et mémoires est en partie régulée par la production de cytokines et de peptides du complexe majeur d'histocompatibilité qui déterminent la taille et la diversité du pool [237]. La prolifération des lymphocytes naïfs qui ont une grande capacité de survie, est conditionnée par l'IL7, celles des TCM par l'IL-7 et l'IL-15 et celle des TEM par l'IL7[238]. Les différentes étapes de l'établissement du réservoir sont représentées et décrites dans la figure 6.

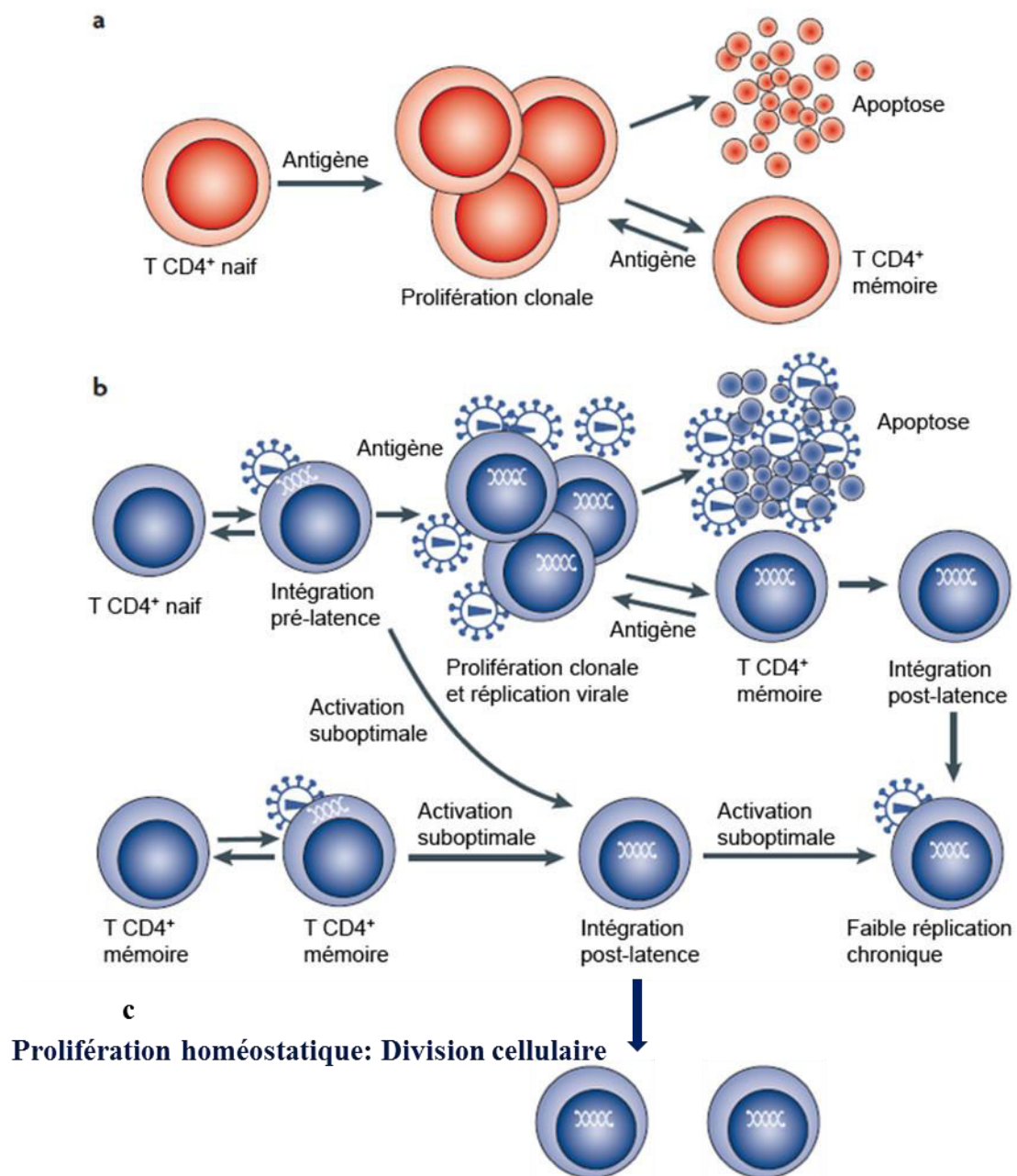


Figure 6 : Etablissement du réservoir du VIH adapté d'après Coiras *et al*, 2009 [59] et prolifération homéostatique lymphocytaire d'après Persaud *et al* 2003 [232].

- a.** Après stimulation antigénique spécifique, les CD4 naïfs se différencient en cellules effectrices pour détruire l'antigène. Quand l'antigène disparaît, ces cellules évoluent soit en apoptose soit en cellules mémoires quiescentes jusqu'à une prochaine stimulation antigénique.
- b.** L'infection par le VIH d'un lymphocyte T CD4 naïf ou bien d'un lymphocyte T CD4 mémoire peut conduire à une infection latente préintégrative. L'ADN viral est alors sous une forme non intégrée, instable et labile [239] ne permettant pas la persistance à long terme du virus [240, 241]. Cette modalité concerne particulièrement les cellules mémoires quiescentes et surtout les naïves qui ont une grande capacité de survie et une longue demi-vie et qui doivent présenter une activation transitoire, suboptimale pour pouvoir être infectées. Le passage à la forme activée de la cellule hôte (CD4 effecteur) par stimulation antigénique idiotypique permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire et la production de virions. Après activation, une partie de ces cellules pourra évoluer en cellules mémoires ou naïves quiescentes (phase de contraction clonale), conserver le provirus dans leur génome, c'est la phase d'intégration post-latence. Cette période de transition est propice à l'intégration du virus dans un lymphocyte toujours permissif à l'infection mais dont le métabolisme n'autorisera pas la réplication [59]. C'est ce type de latence post-intégrative dans ces cellules à longue demi-vie qui rend compte au mieux de la persistance virale [242]. Une nouvelle activation de ces cellules aboutira à la production de nouveaux virions source de nouvelles infections [243].
- c.** Un des paradoxes de l'infection VIH est le très faible nombre de lymphocytes infectés par rapport au nombre de cellules infectables. Ainsi, une seule cellule sur un million contient de l'ADN-VIH [230, 232, 244-246]. Sachant que le pool de lymphocytes quiescents infectés représente 0.05 % des lymphocytes quiescents totaux [247], quotidiennement une centaine de cellules augmente la taille du réservoir de 0,0001 % [248]. Le renouvellement de ce petit pool de cellules infectées est assuré par la stabilité intrinsèque et le renouvellement prolifératif (division clonale) des lymphocytes T CD4 quiescents infectés [232].

2.1.2. La latence virale au niveau moléculaire :

les 4 points

Une fois intégré, le provirus VIH-1 est dépendant de la machinerie cellulaire comme tout lentivirus, pour permettre la production de virions [249]. Le génome viral s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives [50]. Aussi les mécanismes de non activation de certains gènes viraux, pour empêcher l'expression des ARN viraux et la traduction de protéines virales ont été identifiés [250], ils interviennent dans l'établissement et le maintien de la latence virale au niveau moléculaire. Ces mécanismes sont définis en trois groupes qui peuvent être des facteurs cellulaires régulant la latence (effet trans), des facteurs liés à des déficiences des gènes viraux (effet cis) ou à la combinaison des deux (Figure 7).

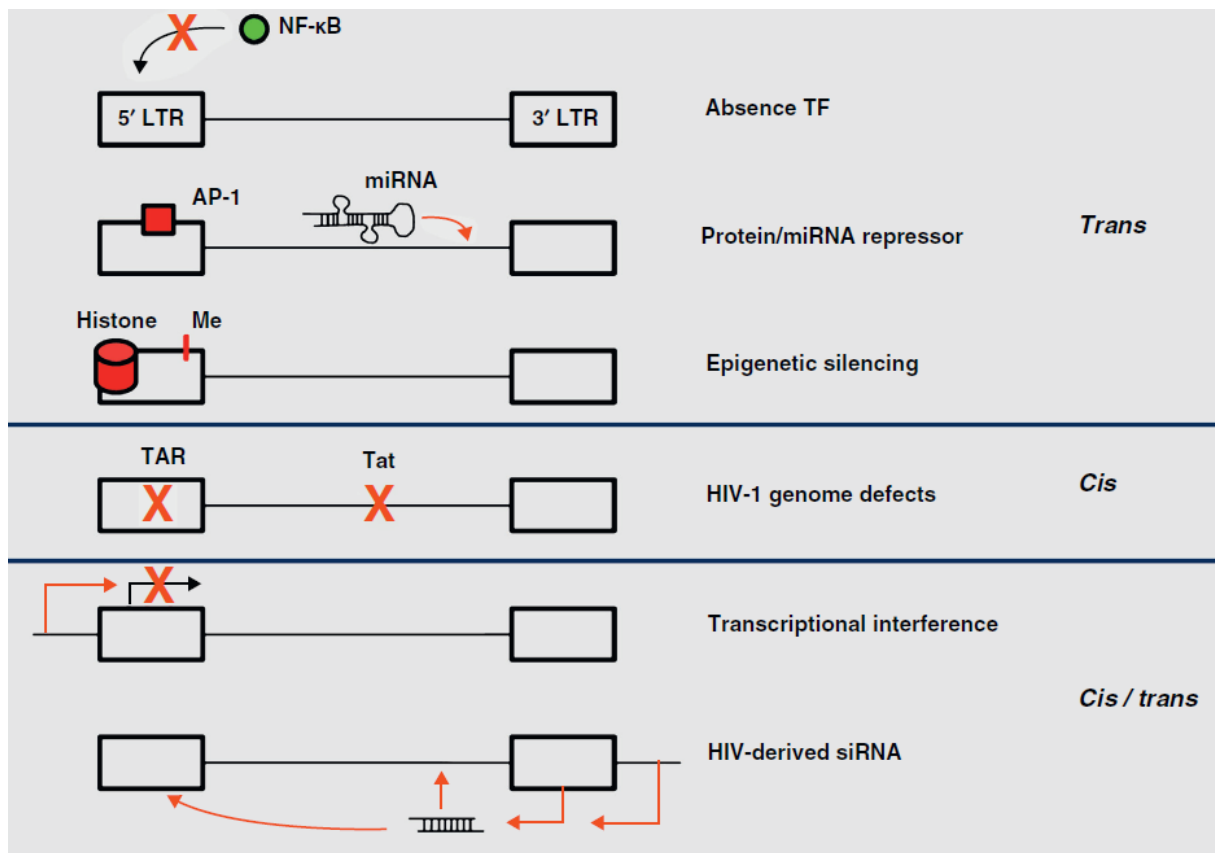


Figure 7 : Mécanismes de la latence au niveau moléculaire d'après Renée Van der Sluis [242].

En *trans* :

- un mécanisme important pour l'établissement et le maintien de la latence et très étudié est celui de la régulation épigénétique par contrôle de la conformation de la chromatine. La chromatine est compactée en nucléosomes en regard du site du promoteur viral empêchant l'accès des facteurs de transcription au site du promoteur viral. Ces modifications sont liées à l'état d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation, de sumoylation et d'ubiquitylation. Dans les cellules quiescentes, la chromatine est sous forme non «acétylée» n'autorisant pas la transcription. En revanche, lors de l'activation cellulaire, la chromatine est sous forme décompactée [53, 54].

- il peut, selon les cellules et leur état d'activation, y avoir des fluctuations dans le noyau cellulaire du niveau des facteurs de transcription NF-κB et SP-1. Ces concentrations peuvent être insuffisantes pour initier la transcription au niveau du promoteur ce qui est le cas dans les cellules T non activées où ils sont majoritairement intracytoplasmiques [250] ii).

En *cis* :

- le virus lui-même peut contrôler la latence par des mutations de ses propres gènes dont le gène *Trans-Activating Response element* (tar). Comme nous l'avons vu la protéine Tat est nécessaire aux phases d'élongation, son absence empêche la transcription [251, 252].

En *Cis/Trans* :

- un mécanisme important jouant un rôle à la fois dans l'intégration et dans le maintien de la latence est l'interférence transcriptionnelle qui va intervenir de façon différente selon la polarité de l'intégration du virus. En cas de même orientation i) si le promoteur du gène cellulaire est plus fort alors ce dernier sera prioritairement transcrit ii) le promoteur peut détourner à son profit (enhancers à proximité du promoteur viral) les facteurs de transcription. En cas d'orientation opposée (polarité négative) par collision des ARN polymérases il y aura diminution de l'expression du gène avec le promoteur le plus faible (mécanisme de la collision des complexes d'ARN polymérase) [253, 254].

- Un autre mécanisme est la surexpression de miRNAs capables d'empêcher la traduction de certaines protéines comme tat ou rev dans les lymphocytes T CD4 quiescents hôte [255].

Le maintien de la latence virale résulte donc de mécanismes intracellulaires complexes régulant l'expression et la transcription du génome viral.

Au total la persistance de la latence virale, de la latence lymphocytaire et la persistance de la production virale par foyers de répliquions cryptiques non accessibles aux antirétroviraux [256] permettent de maintenir le réservoir viral au long cours. L'homéostasie du réservoir est intriquée dans l'homéostasie lymphocytaire [41, 257]. Le maintien de ce réservoir à longue durée de vie est un des facteurs à l'origine de la répliquion résiduelle persistante et de la destruction progressive de lymphocytes T CD4 [258]. L'ensemble de tous ces éléments à l'origine de la dynamique virale dans l'organisme et de la persistance du réservoir constitue un obstacle majeur à l'éradication du VIH dans l'organisme [259].

2.2. Le Réservoir en histoire naturelle

2.2.1. Quantification du réservoir

2.2.1.1. Les différentes méthodes de quantification

L'identification du meilleur marqueur du réservoir fait débat au sein de la communauté scientifique et fait l'objet de nombreuses controverses, au regard des résultats et des techniques différentes entre les études limitant toute comparaison des résultats (Figure 8).

Une des méthodes utilisées pour mesurer la fréquence de cellules latentes transportant du virus à l'état de latence, mais répliatif, est basée sur co-culture de cellules quiescentes hautement purifiées avec les PBMC d'un donneur séronégatif et mesure le nombre d'unités infectieuses produites par million de cellules (IUPM) [247, 260]. Cette méthode est considérée comme méthode de référence par certains auteurs. La limite majeure de l'utilisation de cette technique est la nécessité d'un grand volume de sang tel qu'apporté par des cytophères. En outre, la variabilité de la technique n'est pas connue (pas d'étude de reproductibilité disponible), elle ne peut pas être réalisée avec des biopsies de tissus [261] et sous-estime le nombre de virus infectieux [262].

Chez le patient traité la majorité de l'ADN-VIH est sous forme intégrée [263]. Sa quantification est sans doute le meilleur reflet du réservoir latent sans toutefois distinguer les virus compétents pour la répliation virale. La technique la plus utilisée est la *Polymérase Chain Reaction* (PCR) Alu ; elle correspond à l'appariement d'une paire d'amorce à la fois avec une séquence d'un gène viral (Gag, Pol) et d'une séquence Alu conservée et répétée dans le génome cellulaire. Le standard utilisé doit contenir des séquences virales intégrées à des distances variables des séquences Alu et dans plusieurs orientations car l'amplification de fragments de tailles différentes varie. Une amplification en PCR nichée utilisant des amorces de la région LTR du VIH augmenterait la sensibilité de cette technique. La répétition de cette mesure est nécessaire pour augmenter sa reproductibilité mais est limitée par la nécessité d'obtenir des grands volumes de sang auprès des patients [263-265].

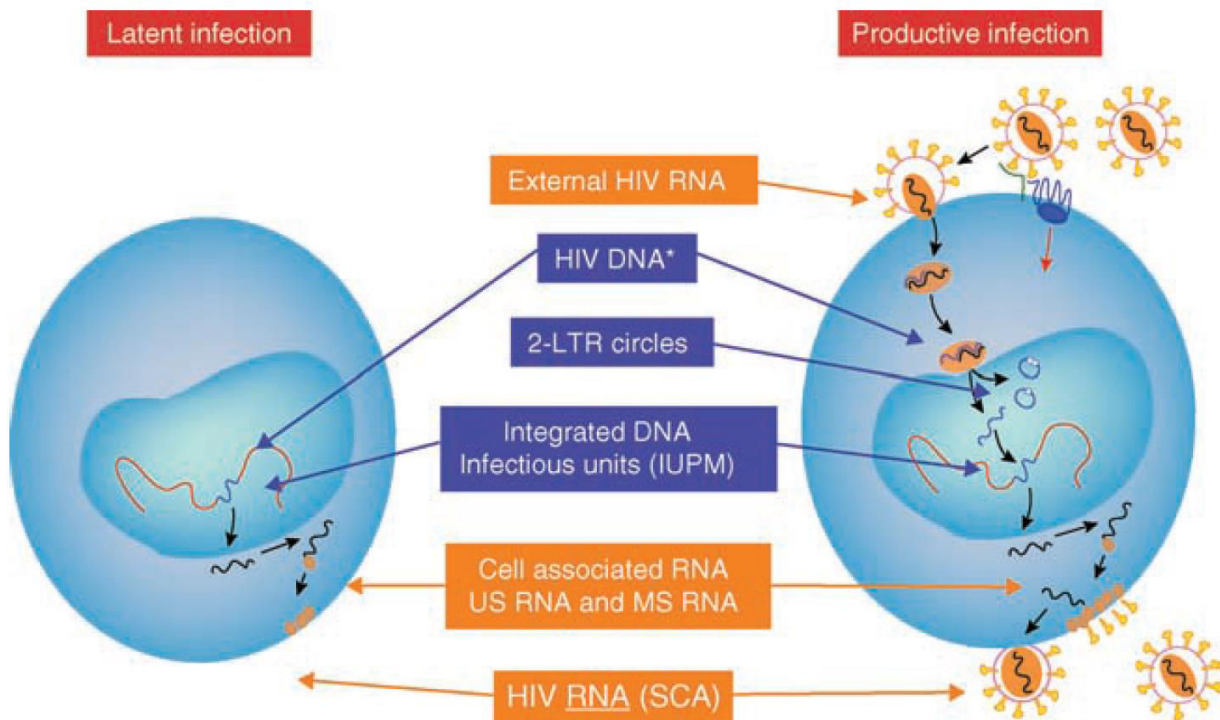
Les formes épisomales non intégrées (cercles 2 LTR, basé sur l'hybridation d'amorces sur une jonction spécifique) dont la labilité dans la cellule est discutée, sont considérées comme des marqueurs d'infection récente et témoin de répliation virale aussi leur

quantification est donc difficile en raison de leur faible durée de vie mais également de leur faible taille [47, 266].

En revanche, la quantification de l'ADN-VIH total par PCR en temps réel (amorces de la région LTR du génome viral, Biocentric Bandol, France) dans les PBMC quantifie les formes intégrées et non intégrées de l'ADN-VIH. Elle est simple, reproductible et réalisable à partir de divers matériel tissulaire ou cellulaire [227] et permet la quantification de l'ADN-VIH dans les différents sous populations lymphocytaires sanguines [267, 268]. Les résultats habituellement exprimés en copies/million de PBMC ou de T CD4 traduisent une fréquence d'infection cellulaire. Il y a une très forte corrélation entre l'ADN-VIH total et intégré chez les patients traités, signifiant que ce marqueur est un bon reflet du réservoir viral [263]. La quantification de l'ADN-VIH permet d'exprimer soit la fréquence d'infection par million de PBMC (ou par million de CD4 ou par million de lymphocytes TN, TCM, TTM, TEM) soit un niveau d'infection quand les résultats sont exprimés en copies par millilitre de sang total. Ce dernier mode d'expression n'est pas encore très utilisé alors qu'il a l'intérêt d'exprimer le réservoir en miroir de l'ARN-VIH (exprimé par ml de plasma sanguin) et des T CD4 (exprimés par mm^3 de sang total). Les trois marqueurs sont ainsi exprimés de la même façon, par rapport à un volume de sang. Le marqueur garde sa valeur prédictive du risque d'évolution de l'infection quel que soit son mode d'expression [269].

La quantification de faibles niveaux d'ARN-VIH plasmatique est maintenant possible par technique de PCR ultrasensible permettant la détection d'une copie/ml de plasma. Les limites de cette technique sont liées au nombre élevé de PCR à réaliser pour être ultrasensible et donc au volume de plasma nécessaire (7ml). Les résultats obtenus par cette technique sont très corrélée à ceux obtenus par quantification de l'ADN-VIH total mais reflète une réplication résiduelle [270, 271]. De plus 80 % des patients traités ont une virémie aux alentours de 3 à 5 copies/ml, limitant dans le temps le suivi de la décroissance sous traitement du réservoir [258, 272]. La mesure de l'ARN du VIH associé aux cellules, comprend la quantification de l'ARN extracellulaire associée à la cellule et des ARN épissés et non épissés intracellulaires. Dans les cellules en phase latente, la production virale étant bloquée l'ARN-VIH extracellulaire associé aux cellules décroît rapidement mais il persiste une production d'ARN épissés et non épissés dans le cytoplasme, dont le type est différent de celui produit par une cellule en phase productive de virus. Ces marqueurs restent encore exclusivement du domaine de la recherche [273].

Les techniques de séquençage du génome viral pour l'analyse phylogénétique des virus sont des autres outils de mesure du réservoir sur le plan qualitatif par l'évaluation de la dynamique entre les compartiments au regard de la diversité virale et est complémentaire des études du niveau des réservoirs [91]. Chaque marqueur à une signification propre mais ne peut répondre à l'ensemble des questions soulevée par l'exploration du réservoir. Ces



différents outils contribueront à mieux déterminer la dynamique du réservoir.

Figure 8 : Représentation des différentes formes virales dans les cellules infectées latentes et productives et les tests de quantification principaux de l'ADN-VIH en bleu et de l'ARN-VIH en marron d'après Lewin *et al.* [261].

2.2.1.2. La quantification du VIH dans les PBMC en histoire naturelle

Le marqueur le plus étudié car facilement réalisable en routine est la quantification de l'ADN-VIH total dans les PBMC qui permet d'estimer le «stock» de cellules infectées [221, 274]. Le niveau d'ADN-VIH dans les cellules du sang périphérique a une valeur pronostique de l'évolution immunologique et clinique indépendamment du compte des lymphocytes T CD4 et de la charge virale ARN-VIH plasmatique [221]. C'est un bon reflet du réservoir total sachant que la majorité des lymphocytes TCD4 circulants et tissulaires contiennent une copie d'ADN-VIH [275, 276]. De plus il existe une bonne corrélation en primo-infection entre les niveaux d'infection sanguins et les compartiments muqueux digestifs mesurés par la quantification de l'ADN-VIH total dans les PBMC [277]. Ainsi, le réservoir sanguin en histoire naturelle est représentatif du niveau d'infection de l'organisme.

Le niveau de réservoir mesuré est le plus élevé en primo-infection et déjà prédictif du risque de progression de l'infection [16, 17, 218, 221]. Aussi en primo-infection le niveau médian d'ADN-VIH dans les PBMC, certes élevé, présente une variabilité inter-individuelle. Il est d'autant plus élevé que le niveau de T CD4 est bas, que le niveau d'ARN-VIH est élevé et que les patients sont symptomatiques : en médiane à $3.30 \log_{10}$ copies/ 10^6 PBMC [1.84-4.93] [218]. Les patients présentant un niveau de réservoir bas en primo-infection auront une évolution plus favorable de l'infection (ADN-VIH $< 3.2 \log$ cop / 10^6 PBMC) [221]. En l'absence de traitement, le suivi de patients pendant 24 mois inclus dans l'étude SEROCO à 6 mois de leur primo-infection a montré que l'ADN-VIH décroît progressivement dans les deux ans suivant leur inclusion pour quasiment se stabiliser en phase chronique. Dans les stades avancés de l'infection avec une immunodépression sévère, les niveaux de réservoirs redeviennent élevés (essai ANRS Etoile) [278]. Par contre les sujets asymptomatiques à long terme contrôlant l'infection depuis 8 ans dans la cohorte ANRS CO15 ALT, présentent un taux d'ADN-VIH très bas à $2.3 \log / 10^6$ PBMC [279]. De même, chez les patients *HIV Controllers* (HIC), le taux médian est de $1,5 \log / 10^6$ PBMC avec un maximum de $2.3 \log / 10^6$ PBMC [280].

En conclusion, il apparaît que déjà en histoire naturelle, le niveau de réservoir est en lien avec le statut immuno-virologique des patients (Figure 9).

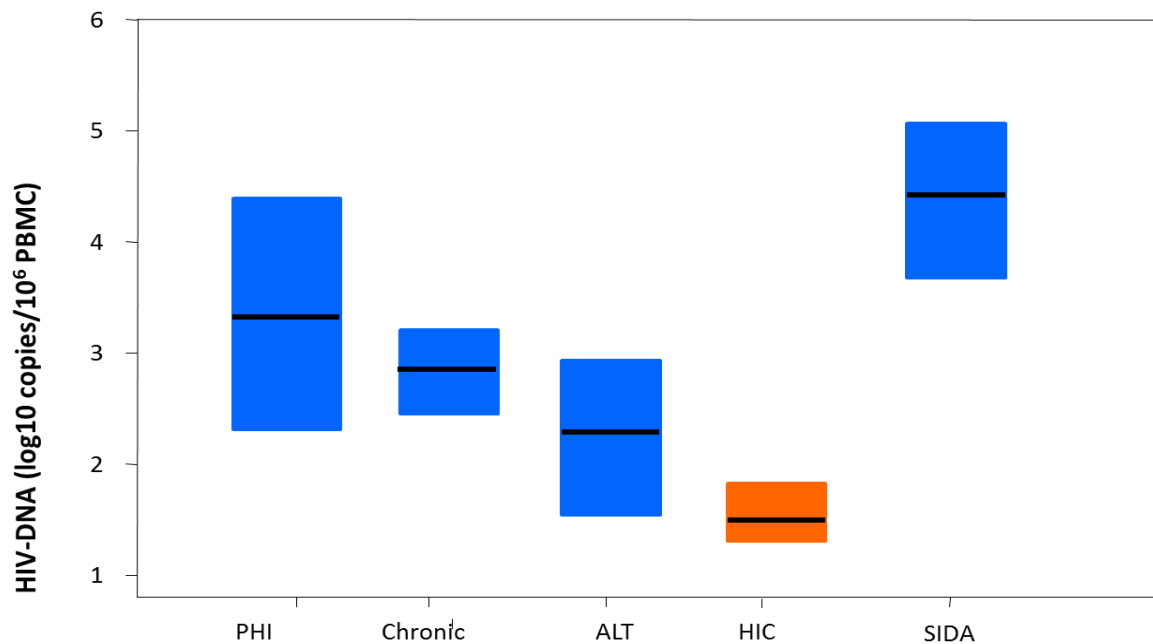


Figure 9 : Quantification de l'ADN-VIH total dans les PBMC dans les différentes cohortes ANRS de patients infectés par le VIH-1, d'après Lewin et Rouzioux, 2011 [261].

Le niveau de réservoir est représenté chez les patients en primo-infection, cohorte ANRS PRIMO [218, 221], en phase chronique ANRS SEROCO [281], chez les patients asymptomatiques à long terme, ANRS ALT [279], les patients *HIV Controllers* ANRS HIC [282] et au stade SIDA, essai ETOILE [278].

2.2.2. Dynamique dans les sous-populations lymphocytaires circulantes

Les résultats obtenus dans les modèles simiens dans des phases d'infection beaucoup plus précoces ont mis en évidence une déplétion majeure des lymphocytes T mémoires avec une destruction de plus de la moitié de ces derniers [66]. Ganesan *et al.* ont rapporté chez des patients en phase tardive de primo-infection (à 225 jours [IQR, 62-296] de la phase de séroconversion) et non traités, une hétérogénéité de la fréquence de chaque type cellulaire. Le nombre total de lymphocytes naïfs (TN) était inférieur à celui observé chez des sujets non infectés [17]. Cependant, les TN étaient la sous-population lymphocytaire dominante alors que le pourcentage de cellules mémoires transitionnelles et effectrices était très diminué. Les TEM et TTM, cellules à demi-vie courte qui expriment le récepteur CCR5 sont une cible privilégiée du VIH. Les TEM exprimant plus massivement le récepteur CCR5 sont alors rapidement détruites comme cela a été montré dans de nombreux modèles simiens [33, 35,

66]. Leur destruction massive est en partie compensée par une prolifération et une différenciation importante des autres lymphocytes mémoires à demi-vie longue [283].

Cette répartition des différentes sous-populations lymphocytaires peut donc s'expliquer par la mort rapide et progressive des TTM et rapide des TEM infectées [17]. Le recrutement des patients en phase tardive de la primo-infection explique une distribution des sous-populations similaire à celle observée chez le patient chronique où les cellules naïves et centrales mémoires sont majoritaires [284].

Dans l'étude de Ganesan *et al.* les sous-populations lymphocytaires mémoires présentent de haut niveau d'infection et une contribution (en prenant en compte la fréquence d'infection de chaque sous-population et la fréquence de chaque sous-population parmi les T CD4 quiescents au réservoir au moment de la primo-infection) importante au réservoir. Les cellules naïves infectées présentent une faible fréquence d'infection et contribuent peu au réservoir [17], de même que chez les patients chroniques [245]. Cependant leur faible probabilité de stimulation antigénique, leur longue demi-vie [285] et leur très bonne capacité proliférative leur confèrent un rôle primordial dans le maintien du réservoir à long terme. L'infection notable mais plus faible des cellules naïves, par un virus de tropisme R5, pourrait être la conséquence d'une faible expression de ces récepteurs à la surface des TN [286] et de leur infection importante dans le thymus qui est très affectés par le VIH [287].

Chez les patients chroniques, l'étude des sous-populations sanguines a été peu explorée. En phase chronique sans traitement le stock de cellules naïves reste diminué et inférieur par rapport à un sujet non infecté, ce qui peut s'expliquer par la fibrose progressive des tissus lymphoïdes [288]. Les lymphocytes naïfs contribuent faiblement au réservoir par leur faible fréquence d'infection [289], mais leur rôle dans le maintien de l'homéostasie lymphocytaire chez les singes infectés par le SIV est central [290]. Les lymphocytes T CD4 mémoires centrales ont un niveau d'infection supérieur à celui des effectrices mémoires et représentent majoritairement le réservoir [246]. Les données dans le modèle simien présentant une infection chronique par le VIH, retrouvent des fréquences d'infection des sous-populations lymphocytaires mémoires effectrices et transitionnelles supérieures à celles des centrales mémoires, avec une destruction massive des cellules différenciées dont le renouvellement dépend du pool de TCM [291].

Sous traitement, Chomont *et al.* ont mis en évidence chez 45 patients chroniques avec une charge virale indétectable, que les fréquences d'infection des sous-populations lymphocytaires mémoires, centrales (TCM), transitionnelles (TTM) et effectrices (TEM)

étaient équivalent avec une contribution dominante pour les TCM qui assure la persistance du réservoir par prolifération homéostatique [245].

Ainsi, les TCM par leur longue durée de vie, leur survie et leur capacité répliquative jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie lymphocytaire et dans la persistance du réservoir [66] et leur atteinte conditionne le niveau de progression vers le stade SIDA [173, 291]. De plus, chez les patients Long Term Non Progressor (LTNP) les cellules centrales mémoires sont protégées de l'infection et les TTM sont la sous population qui contribue le plus au réservoir [292]. Aussi la préservation du nombre de TCM, semble être un élément en bénéfique dans le contrôle de l'infection virale.

2.2.3. Les autres cellules impliquées dans le réservoir

L'existence d'autres réservoirs cellulaires autre que le stock majoritairement établi dans les T CD4 quiescents [245, 268, 293] trouve son rationnel dans la mise en évidence de virus plasmatiques retrouvés après arrêt de traitement différents des virus clonés dans les sous-populations lymphocytaires T CD4 [294]. Le même constat a été fait chez des patients traités présentant une charge virale résiduelle qui est en partie liée à la production de virus à partir de réservoirs cellulaires autres que les lymphocytes T CD4 quiescents [295].

2.2.3.1. Les monocytes/macrophages

Les monocytes précurseurs des macrophages expriment les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4 électifs du VIH et peuvent donc être infectés [296] ; cependant ils sont très résistants aux effets cytopathiques des virus [297] et les antirétroviraux y pénètrent peu [298, 299]. L'intégration de l'ADN-VIH dans leur génome a été démontré [300] ainsi que l'archivage de virus dans des vésicules endosomiques [61]. Leur capacité à produire du virus a été mise en évidence chez des patients au stade SIDA [301-303] ou 10 % des macrophages peuvent être infectés. Chez le patient au stade chronique, elles contribuent pour moins de 1% à l'ADN-VIH du sang périphérique [42] et les clones viraux sont phylogénétiquement distincts de ceux présents dans les T CD4 [304]. Leur demi-vie courte de quelques jours avant leur différenciation en macrophages et le turn-over important de ces derniers [305] laissent à penser que ces cellules représentent un réservoir temporaire de virus mais sont importants du fait de leur dissémination tissulaire [305]. Les macrophages peuvent persister

plusieurs années dans des compartiments comme le système nerveux central [229], ils se concentrent particulièrement dans la muqueuse du tube digestif [293] et sont des cellules très migratrices ce qui leur confèrent un rôle important dans le maintien du réservoir [305, 306].

2.2.3.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques expriment peu les récepteurs électifs du virus à savoir CD4, CXCR4 et CCR5 mais capte le virus à leur surface par la lectine DC-sign [130]. Il existe plusieurs types de cellules dendritiques (DCs), les DCs myéloïdes (MDCs) présentes dans les ganglions, le sang, le thymus, les ganglions lymphatiques, les DCS plasmacytoïdes (PDCs) localisées dans les muqueuses ou le tissu cutané (cellules de Langerhans). Les PDCs peuvent être infectées et produire du virus [206, 307]. Les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) présentes dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes sont capables de capter un grand nombre de particules virales à leur surface. Aussi, les cellules dendritiques malgré une durée de vie courte (de quelques jours) ont une fonction migratoire dans l'organisme [130] et permettent la dissémination de l'infection virale. Les FDCs qui ont la capacité de capter un grand nombre de particules virales à leur surface jouent ainsi un rôle de réservoir dynamique [308, 309].

2.2.3.3. Les lymphocytes NK

Les lymphocytes NK ont été peu étudiés au cours de l'infection à VIH. Une faible fraction de lymphocytes NK (CD56+CD3-) exprime le récepteur CD4 et peut être infectée par le VIH [310, 311]. L'analyse longitudinale des niveaux d'ADN-VIH dans les cellules NK de patients traités 1 à 2 ans par antirétroviraux a indiqué que les cellules NK restent infectées de façon persistante. Ces résultats démontrent qu'un sous-ensemble de cellules non-T avec des marqueurs NK reste infecté et suggèrent un rôle des NK pour la persistance virale. A contrario, une autre étude sur les prélèvements sanguins de trois patients ne retrouvait pas de NK (CD56+CD3-) infectés après 7 ans de traitement [304]. Aussi les propriétés de réservoir de ces cellules sont encore à préciser.

2.2.3.4. Les lymphocytes T CD8

L'infection des lymphocytes T CD8 a été rapportée chez des patients en primo-infection [312]. Les fréquences d'infection sont variables suivant les populations (TN, TTM,

TCM) [246] et conditionnées par le niveau d'expression du récepteur CD4 qui est faible et fugace dans les différentes phases de différenciation des lymphocytes T CD8 [313]. Aussi, les lymphocytes T CD8 ne sont pas considérés comme un réservoir du VIH.

2.2.3.5. Les lymphocytes B

Il existe quelques preuves *in vitro* que les lymphocytes B peuvent s'infecter après expression de faibles niveaux de CD4 et CXCR4 [314]. Par ailleurs au même titre que les DCs, les lymphocytes B peuvent capter le VIH à leur surface et transférer les lymphocytes T CD4. Leur rôle de réservoir au regard de leur demi-vie inconnue reste posé [314].

2.2.3.6. Les cellules myéloïdes

Les cellules myéloïdes précurseurs des divers types cellulaires résistent à l'infection virale [315]. Seules des cellules progénitrices hématopoïétiques exprimant CD34 pouvant exprimer le CD4 et donc infectables ont été retenues récemment comme potentiel réservoir [316].

2.2.4. Dans les tissus

2.2.4.1 Le tissu lymphoïde

Le tissu lymphoïde est le réservoir anatomique majeur du VIH où se concentrent 98 % des lymphocytes. Les principaux organes lymphoïdes secondaires où se concentrent les lymphocytes T CD4 sont les ganglions lymphatiques, la rate, le tissu lymphoïde digestif et secondairement les organes lymphoïdes primaires représentés par le thymus et la moelle osseuse [70, 197]. Les ganglions qui ont un rôle pivot dans la multiplication du virus ont été caractérisés comme un des réservoirs majeurs du VIH par l'infection au long cours des cellules des follicules lymphoïdes, notamment les cellules dendritiques folliculaires qui captent à leur surface le VIH et perdurent plusieurs mois. Leur capacité à infecter de nouvelles cellules T CD4 dans les ganglions est à l'origine de la réplication virale chronique [70, 309, 317, 318]. Chez les singes de type Sooty mangabey, hôtes naturels de l'infection par le SIV, la clairance du virus dans les zones corticales des ganglions lymphatiques est rapide et associée à une moindre infection des centres germinatifs, contrairement à ceux qui est observé chez les singes de type Rhésus macaques présentant une infection VIH évolutive [319]. Ainsi

le microenvironnement dans les centres germinatifs semblent jouer un rôle pivot dans la progression de l'infection par le VIH dès la primo-infection [320-322].

2.2.4.2. Le tissu lymphoïde digestif

Le tissu lymphoïde digestif (GALT) réservoir anatomique principal est composé de tissus organisés avec des structures lymphoïdes secondaires telles que les plaques de Peyer et en structure très hétérogène dans la *lamina propria*. Elle contient des macrophages, des cellules dendritiques, des plasmocytes, et 40 à 60 % des lymphocytes y serait concentré. [293]. Les données divergent sur ce dernier point, d'autant qu'une étude récente rapporte, après examen post-mortem de plusieurs mammifères (rat, souris, homme), que moins de 20 % des lymphocytes résideraient dans le GALT [323]. Après l'entrée à travers la couche épithéliale, le VIH-1 a l'accès à une population dense de lymphocytes T CD4 de la *lamina propria* qui sont plus sensibles à l'infection que les lymphocytes circulants par l'expression importante des corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4 du VIH [201, 202]. La majorité des lymphocytes CD4 intestinaux est de type effecteur ou effecteur mémoire activé et dans une moindre proportion des cellules CD4 naïves [66]. Ces cellules CD4 intestinales sont donc des cibles particulières du VIH en étant activées de façon quasi permanente du fait de leur exposition à une multitude d'antigènes, et permettent un essaimage potentiel de l'infection au niveau systémique [324]. Il existe à ce niveau un défaut quantitatif en lymphocytes T CD4 conséquence de la destruction massive de cellules infectées sur ce site [324, 325].

Cependant l'analyse phénotypique des sous-populations T CD4 dans ces études montre qu'il y a un enrichissement en TMT et en TEM au niveau du rectum comparé au sang périphérique prouvant le renouvellement cellulaire au long cours de ces cellules infectées [325]. En primo-infection, les modèles simiens et les rares études chez l'homme ont montré une chute drastique du nombre de TEM et TTM. La décroissance des TEM est certes liée à leur destruction mais aussi à leur non compensation par épuisement progressif du pool de lymphocytes TCM [291, 326].

La charge ARN-VIH dans ces organes lymphoïdes chez l'homme est généralement 10 fois supérieure à celle observée dans le sang périphérique en primo-infection [16]. Les informations recueillies dans l'étude de biopsies du tube digestif chez des patients chroniques traités nous montrent des niveaux d'infection (ADN-VIH1 total) 3 fois plus important au niveau du duodénum et jusqu'à 10 fois plus important au niveau du rectum que ceux mesurés

dans les PBMC [325, 327]. La production virale exprimée par le ratio ARN-VIH/ADN-VIH est cependant plus faible au niveau du tractus gastro-intestinal comparé au sang, excepté au niveau de la partie terminale de l'iléon où les TMT et TEM sont plus infectés que leurs homologues sanguines [325]. Il a d'ailleurs été montré une compartimentalisation de clones viraux dans les cellules de biopsies rectales différents à la fois des clones liés à la réplication virale dans le GALT [328] et des clones viraux plasmatiques [91]. Le GALT contribue donc à la production virale au long-cours.

Dans les phases précoces de l'infection, il a été proposé, que les lymphocytes du tube digestif, qui sont majoritairement de phénotype quiescent, soient des acteurs contribuant particulièrement à la réplication virale massive dans ce tissu et au réservoir [33]. Cependant des travaux récents remettent en cause ce dernier point. Le tissu lymphoïde digestif ne serait peut-être pas la source majeure de production virale directement responsable du pic viral plasmatique initial, au regard de la déplétion en lymphocytes T CD4 importante mise en évidence dans des modèles simiens [329, 330]. La localisation majoritaire du réservoir dans le colon ou l'iléon est remise en cause car chez le macaque d'origine chinoise dont la dynamique d'infection est proche de celle observée chez l'homme, le réservoir serait plus importants dans les ganglions mésentériques [331]

Le GALT est toujours considéré à ce jour comme un réservoir majeur du VIH [197, 327, 332], mais la taille de ce réservoir par rapport aux autres organes lymphoïdes en primo-infection est discutée. Ce tissu reste néanmoins un réservoir important et facilement accessible aux prélèvements chez l'homme et il paraît probable que l'entretien de ce réservoir soit particulièrement lié à une faible réplication virale persistante.

2.2.4.3. Le compartiment génital

L'infection des organes du tractus génital a été mise en évidence dès la primo-infection et persiste dans les phases chroniques de l'infection chez l'homme [333, 334] et chez le singe [335]. Le sperme dans lequel est retrouvé du virus chez les patients non traités [336] est composé de plasma séminal et de cellules des testicules, de l'épididyme, de la prostate, des vésicules séminales et des glandes urétrales. Les spermatozoïdes ne sont pas infectés par le virus [337]. Le VIH est retrouvé sous forme de particules virales libres dans le liquide séminal et sous forme de particules virales intégrées dans des leucocytes infectés [333]. Il est facilement détecté chez des sujets non traités à des niveaux variables selon les individus [338].

Dans le tractus génital féminin, beaucoup moins étudié, le VIH est également présent sous forme de virions libres ou intégrés, dans les macrophages, les lymphocytes et dans les lymphocytes mémoires, qui sont les premières cellules infectées au moment de la contamination [338, 339].

Les études phylogénétiques montrent une double origine de la production de virus dans le sperme traduisant une compartimentalisation du virus dans le compartiment génital, à la fois produit par les organes séminaux et provenant de virus plasmatiques circulants, [340, 341]. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence la persistance de particules virales et de cellules infectées dans le sperme d'environ 5 à 10 % des patients sous traitement antirétroviral efficace depuis au moins 6 mois [342-344]. Combiné à la faible diffusion de certains antirétroviraux dans ce compartiment [345, 346], ces résultats suggèrent que les compartiments génitaux et le sang sont probablement des réservoirs distincts pouvant abriter des formes latentes du VIH-1 sous traitement antirétroviral prolongé [347].

2.2.4.4. Le système nerveux central

Les informations sur l'infection du système nerveux central (SNC) proviennent essentiellement des résultats anatomopathologiques des autopsies de patients en stade SIDA. Le cerveau étant dépourvu de lymphocytes, les principales cellules réceptrices exprimant le CCR5 et le CD4 sont les astrocytes, les macrophages périvasculaires et les cellules gliales activées [348]. Des lymphocytes infectés peuvent être retrouvés dans des infiltrats périvasculaires [348]. Le rôle des macrophages et des cellules gliales comme réservoir pouvant produire des virus a été bien établi [229, 349, 350]. Celui des astrocytes est plus controversé. Ces cellules peuvent intégrer l'ADN-VIH dans leur génome [351] et il a été mis en évidence qu'elles pouvaient exprimer des protéines virales comme Tat [352] et produire du virus à bas niveau [353]. De plus, elles font partie des cellules de l'organisme à la plus longue demi-vie ce qui leur donne toutes les caractéristiques d'un réservoir [354]. Des analyses phylogénétiques ont révélé une compartimentalisation dans les macrophages et les astrocytes du cerveau de clones différents de ceux circulants [355]. Ces clones étaient également retrouvés dans les méninges suggérant la production de virions pouvant migrer hors du cerveau [356].

Enfin, les virus produits sont protégés de l'action des antirétroviraux en raison de leur mauvaise pénétration dans le parenchyme cérébral [357]. Aussi, le système nerveux central est un réservoir fonctionnel. Les conséquences immunopathologiques *in situ* à type

d'inflammation sont directement liées au niveau des réservoirs pour les troubles neurocognitifs (HAND) [358] et peuvent, à terme, avoir des conséquences cliniques redoutables [354, 359, 360].

3. Impact des traitements en primo-infection

3.1. Impact Immuno-virologique

3.1.1. Impact sur le *set-point* virologique et les lymphocytes T CD4

Les trithérapies permettent d'obtenir chez les patients chroniques un gain du nombre de T CD4 (80 à 100 par an) et une charge ARN-VIH plasmatique indétectable (< 50 copies/ml) [361]. La décroissance de la charge virale ARN-VIH est initialement rapide durant les deux premières semaines puis suivi d'une deuxième phase de décroissance plus lente pour aboutir à l'indétectabilité [232]. Ce contrôle virologique est associé à une bonne restauration immunitaire [362] et permet de réduire la mortalité et la morbidité chez ces patients [161, 363, 364].

En primo-infection, le bénéfice d'un traitement a été longtemps controversé en raison des résultats variables selon les études [32, 365-370]. Alors que certains auteurs rapportent un bénéfice clinique en termes de T CD4, corrélé au contrôle virologique [370-372], ces résultats n'étaient pas confirmés par d'autres [373-375]. Une étude de cohorte récente rapportée par Hocqueloux *et al.* sur plus de 10 ans de suivi de patients ayant une charge virale indétectable, soit traités en primo-infection, soit en phase chronique suggère que la restauration immunitaire avec un ratio CD4/CD8 >1 est meilleur au long cours quand le traitement est initié dans les quatre mois de la primo-infection et avec un nombre de T CD4 > 500/mm³ au moment de l'initiation du traitement [376], résultats retrouvés dans une autre cohorte de patients traités en primo-infection et suivis pendant 48 semaines [372]. Des rapports divergents existent quant à l'impact d'un traitement initié en primo-infection sur le niveau stabilisé de charge virale (*set-point*). Certaines études montrent un bénéfice [370, 371, 377-381] d'autres non [379, 382-386].

Toutes ces études étaient difficilement comparables par le fait que les stratégies thérapeutiques appliquées dans ces essais en terme de délai d'initiation de traitement par rapport à la contamination, de molécules utilisées, la plupart utilisant des trithérapies avec des durées de traitement qui étaient très différents [387].

Les résultats d'un essai conçu pour tenter de répondre à cette question n'ont pas permis d'y répondre. Cette étude randomisée *SETPPOINT trial* [388] récemment publiée

évaluait l'impact d'un traitement relativement précoce (moins de 6 mois) *versus* un traitement différé avec interruption au bout de 36 mois. En raison des critères immunologiques sévères de début de traitement dans le bras différé ($<350 \text{ CD4/mm}^3$ ou ARN-VIH $>750 \text{ 000 cop/ml}$), la progression vers le stade SIDA dans ce groupe était importante et l'essai a été prématurément arrêté ne permettant d'évaluer la différence au set point virologique dans les deux bras. La question a également été étudiée avec une approche méthodologique différente comme dans la cohorte PRIMO: chez 58 patients traités dans les 3 mois et demi après la contamination, comparés à 116 patients non traités de la cohorte SEROCO, il n'y avait pas de différence entre les set-points virologiques 12 mois après l'arrêt d'un traitement efficace [382].

Mais plus récemment un essai contrôlé randomisé néerlandais, mené chez 173 sujets en primo-infection aigüe recevant soit un traitement immédiat de 24 semaines (38 patients), soit un traitement immédiat de 60 semaines (38 patients), soit pas de traitement (36 patients), a conclu qu'un traitement précoce et temporaire diminuait le set-point virologique et le délai de reprise de traitement avec un relatif maintien du taux de CD4. De plus dans cette étude, les auteurs notait que la qualité de vie de ces patients traités en primo-infection s'était améliorée [389].

Les résultats récents de l'essai randomisé SPARTAC ayant inclus 360 sujets traités primo-infection (stade Fiebig I à V), pendant soit 48, soit 12 semaines dans les 6 mois de la primo-infection en comparaison à un bras sans traitement, suggèrent qu'un traitement transitoire pendant 48 semaines peut être associé à un bénéfice virologique persistant 36 semaines, avec une reprise du traitement ($\text{T CD4} < 350/\text{mm}^3$) 65 semaines plus tard que dans les autres groupes. Ce bénéfice était d'autant plus marqué que les patients étaient traités tôt en primo-infection [390]

Ainsi, les résultats des études randomisées récentes plaident clairement en faveur du bénéfice immuno-virologique d'un traitement initié en primo-infection. Néanmoins ce bénéfice obtenu sous traitement n'est pas maintenu en cas d'arrêt thérapeutique, ce qui constitue un argument pour poursuivre le traitement à distance de la primo-infection [369, 390].

Les guidelines des différentes sociétés savantes et rapports d'experts français, européens, United States of America (USA), s'accordent depuis peu à recommander le traitement chez tous les patients en primo-infection [1, 391-394].

Ainsi, le rapport 2013 du groupe d'experts Français dirigé par le Professeur P. Morlat a élargi les indications thérapeutiques en primo-infection aux patients asymptomatiques, quels

que soient les niveaux de lymphocytes T CD4 et de charge virale, le délai d'initiation de ce traitement devant être court pour limiter la constitution du réservoir viral et protéger le système immunitaire. Les questions persistantes sur l'impact d'un traitement immédiat en primo-infection justifient que les patients soient inclus dans la cohorte ANRS CO6 PRIMO et dans les essais thérapeutiques. Les objectifs du traitement en primo-infection sont d'obtenir une charge virale indétectable à 6 mois de l'instauration du traitement ou à 12 mois si le niveau de charge virale initiale était très élevé. Le bénéfice du traitement étant également de préserver ou restaurer un nombre élevé de T CD4 et de juguler les symptômes. De plus en cas de grossesse, le traitement a pour objectif de réduire le risque de transmission materno-fœtale. Les modalités de traitement sont différentes de celles de l'infection chronique. Il est nécessaire de prendre en compte l'épidémiologie des souches virales transmises en termes de résistances et de la prise d'un traitement antirétroviral préventif de pré-exposition. Le traitement pourra être débuté sans attendre les résultats du bilan pré-thérapeutique (phénotypage HLA-B*5701, test génotypique de résistance). Ainsi le traitement doit comporter 2 inhibiteurs nucléosidiques, en privilégiant le ténofovir associé à un troisième agent qui est en première intention un inhibiteur de protéase (IP). La combinaison thérapeutique sera ensuite adaptée selon les résultats du test génotypique de résistance, de la tolérance et des comorbidités, dans l'optique d'un maintien au long cours [1].

3.1.2. Protection des réponses immunitaires systémiques

Les lymphocytes T CD4 helper et T CD8 sont des acteurs majeurs du contrôle de l'infection VIH en primo-infection [161]. Hormis la restauration du nombre de T CD4, connue depuis longtemps [361], plusieurs études ont montré une préservation des fonctions T-helper des T CD4 par le traitement initié en primo-infection [371, 378, 395-398].

Ainsi, sur un petit nombre de sujets (8) traités en primo-infection dans les 6 mois de la contamination, l'activité spécifique anti-VIH des lymphocytes T CD4 et T CD8 est préservée seulement chez les patients ayant débuté leur traitement au moment de la séroconversion [396]. Dans le même sens, Rosenberg *et al* ont montré chez 8 sujets, dont deux en stade *Fiebig II*, traités précocement, une préservation relative des fonctions adaptative spécifique T CD4 T CD8 (prolifération, production d'IFN- γ) qui étaient d'ailleurs corrélées avec une charge virale basse après arrêt de traitement [378]. Cette préservation est toute relative car, les

fréquences de cellules T CD8 diminuent sous traitement [399, 400], limitant la contribution et la préservation des réponses T CD8 spécifiques [401]. De plus, les fréquences des cellules T CD4 augmentent [378, 402], alors que ces cellules conservent des capacités fonctionnelles limitées [403]. Les autres marqueurs telles que les capacités de synthèse d'IL-2 et de prolifération ne sont que très incomplètement observées et ne portent que sur une minorité de cellules mémoires [404, 405].

D'autres études ont mis en évidence une préservation des réponses des cellules T plus importante en cas de traitement initié en primo-infection, par rapport à un traitement en phase chronique [406]. La préservation des réponses T est associée à une diminution de l'activation, laquelle est associée à une baisse du niveau des cytokines plasmatiques (INF α , IL7, IP-10), à une baisse de l'activité thymique [407] et des marqueurs d'inflammation (d-dimères) [408, 409]. De plus, il a été rapporté que ces marqueurs étaient corrélés à la charge ARN-VIH [410, 411]. Par ailleurs, l'initiation d'un traitement précoce est associé à un profil de réponses T spécifique du VIH-1 similaire à celui observé chez les *HIV Controllers* [412] qui pourrait conférer une bonne restauration du réseau réticulaire fibroblastique et une meilleure reconstitution du pool de lymphocytes T CD4 [288]. Il persiste cependant un certain niveau d'activation immunitaire [413] qui peut être délétère au long cours et être à l'origine d'une production virale résiduelle, laquelle entretient aussi l'activation [414].

L'impact d'un traitement en primo-infection sur l'immunité innée est encore très peu connu. Une étude récente a montré chez 73 patients en primo-infection aigüe, qu'un traitement précoce permettait de restaurer le nombre et l'activité anti-VIH des cellules *Natural Killer* [415] alors qu'un traitement plus tardif ou en phase chronique ne limitait pas le déclin des NK [158]. Par ailleurs, un traitement précoce permet une restauration du nombre de cellules dendritiques [127].

Les auteurs des deux études les plus complètes sur les réponses des cellules B de patients traités, ont rapporté une perte rapide des cellules spécifiques B anti-VIH, suivie d'une diminution plus progressive dans les titres d'anticorps contre le VIH d'autant plus rapide que le patient est traité en primo-infection avec une meilleure préservation des réponses lymphocytaire B aux antigènes VIH et non VIH [189, 416].

3.1.3. Impact du traitement sur la transmission et la diversité virale

3.1.3.1. Impact sur le risque de Transmission

L'impact du traitement sur la charge virale génitale [417, 418] a renforcé le concept de *Treatment AS Prevention* pour réduire les risques de transmission sexuelle et à terme limiter l'épidémie. La question du TASP est particulièrement importante en primo-infection où les niveaux de charge virale plasmatique et génitales sont élevés et le diagnostic pas toujours établi, cela majorant les risques de transmission [419]. A ce jour l'essentiel des études en primo-infection ont évalué l'efficacité immuno-virologique de traitements pour lesquels l'arrêt était suivi de rebonds virologiques. L'essai SPARTAC [390] évaluant le bénéfice d'un traitement (12 ou 48 semaines) en primo-infection rapporte des niveaux de rebonds virologiques très significativement moindres que ceux observés chez des patients traités en phase chronique et en arrêt de traitement dans l'essai SMART [420]. L'adjonction d'une vaccination (ALC-VIH ou Remune) chez des patients dans une sous-étude de l'essai QUEST qui évaluait l'impact de 12 mois de trithérapie en primo-infection a mis en évidence des rebonds virologiques ne dépassant pas 1000 cop/ml 24 mois après l'arrêt de traitement, niveau qui était considéré par certains comme suffisant pour limiter le risque de transmission [384].

Néanmoins ce bénéfice sur la charge virale suivant les stratégies thérapeutiques recommandées à ce jour reste temporaire, comme rapporté dans la cohorte suisse où la charge virale post arrêt d'un traitement de 18 mois restait inférieure à celle de sujets contrôles non traités pendant un an pour atteindre un niveau équivalent les années suivantes. De plus, même si le taux de transmission était plus élevé chez les patients non traités, un nombre non négligeable de transmissions secondaires sont survenues après l'arrêt de traitement [387]. Au total, les arrêts de traitement en primo-infection aboutissent à un rebond virologique chez la majorité des patients majorant le risque de transmission.

3.1.3.2. Traitement et diversité virale

En raison de la transmission possible de virus présentant des mutations de résistance aux antirétroviraux [421], il est recommandé d'effectuer un test génotypique de résistance avant l'initiation du traitement antirétroviral [1, 422]. En effet, on pourrait s'attendre à ce

qu'une souche virale acquise au moment de la primo-infection et présentant des mutations de résistances aux antirétroviraux VIH-1 ne persiste pas au profit des souches sauvages comme cela est le cas chez les patients en phase chronique et chez ceux en arrêt de traitement pour échec thérapeutique, [423, 424]. Cependant, il a été récemment démontré que les variants résistants transmis au moment de la primo-infection envahissaient les cellules réservoirs et donc persistait pendant de longues années après la période de primo-infection VIH sans pression de sélection thérapeutique [87, 425-429]. Les techniques de génotypage actuels ne permettent pas la détection de virus résistants quand ils représentent moins de 20-25 % des variants [430]. Néanmoins, l'utilisation des techniques par *ultra deep sequencing* permettra très probablement d'abaisser ce seuil [431] et d'optimiser le choix des antirétroviraux prescrits en primo-infection [432]. En cas de transmission de virus sauvages plusieurs études montrent chez des patients avec une bonne observance au traitement, que le risque d'émergence de mutants résistants est diminué quand le nombre de lymphocytes T CD4 est élevé ($>350/\text{mm}^3$) [433].

L'analyse phylogénétique des virus dans le sang de chez 7 patients traités en primo-infection a montré l'absence frappante d'évolution génétique dans les populations virales après plusieurs années de traitement, ce qui est un reflet de l'efficacité suppressive du traitement sur la réplication virale dans les cellules des différents compartiments de l'organisme [434]. De même, une autre équipe a montré l'absence d'évolution du profil génétique des virus présents dans le GALT et le sang chez 5 patients traités en primo-infection [435]. Le traitement précoce limite la diversification génétique des virus dans le sang et dans le GALT impactant très probablement la réponse immune, par la limitation des variations épitopiques, variations responsables d'une moindre efficacité des réponses anti-VIH spécifique au cours de l'infection [435, 436]

3.1.4. Bénéfice clinique

En effet, il a été clairement établi que lors de primo-infection symptomatique le traitement permettait de réduire l'intensité et la durée des symptômes [370, 371, 373, 379, 388, 437, 438], la fréquence des infections opportunistes et l'évolution vers le stade SIDA [439]. De plus, traiter en primo-infection à un effet neuroprotecteur en limitant les processus [370] immunologiques délétères pour le système nerveux central [389, 440-442] et permet une nette amélioration de la qualité de vie des patients [389].

3.2. Impact du traitement en primo-infection sur le réservoir

3.2.1. Impact du traitement sur les réservoirs évalué dans les PBMC

Comme l'établissement du réservoir se fait rapidement au cours de la primo-infection, il est considéré que les traitements antirétroviraux qui ont été utilisés jusqu'à présent, ne peuvent atteindre un réservoir déjà constitué [443]. Cependant, ils pourraient avoir un impact et interrompre la poursuite de sa constitution.

Basé sur l'hypothèse qu'un traitement antirétroviral supprimait la réplication virale à 100 %, une modélisation mathématique a révélé 4 phases de décroissance virale correspondant à la demi-vie de différentes populations de cellules infectées dont principalement les sous populations lymphocytaires mémoires [444]. Le traitement par *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) évite de nouveaux cycles infectieux mais n'a pas d'effet sur la mortalité cellulaire et la production virale par ces cellules infectées. Dans certains compartiments ou sanctuaires, les tissus lymphoïdes notamment, les ganglions sites de réplication virale particulièrement, la diffusion des traitements n'est pas optimale laissant des foyers cryptiques de réplication [256]. Ces nouvelles infections peuvent être dues soit à la transmission directe du virus de cellule à cellule [445], soit par libération des virus piégés dans le réseau de cellules dendritiques folliculaires [309] et contribuent à entretenir le réservoir [258, 446-453]. Ce virus compétent persiste pendant des années chez les patients traités [454]. Chaque phase de déclin de la virémie reflète la mort ou l'élimination des différentes populations infectées [260, 454-457], illustré par le modèle par Sarah Palmer qui décrit quatre phases différentes de l'impact des traitements antirétroviraux sur une cohorte de patients traités au stade chronique par trithérapie (Figure10).

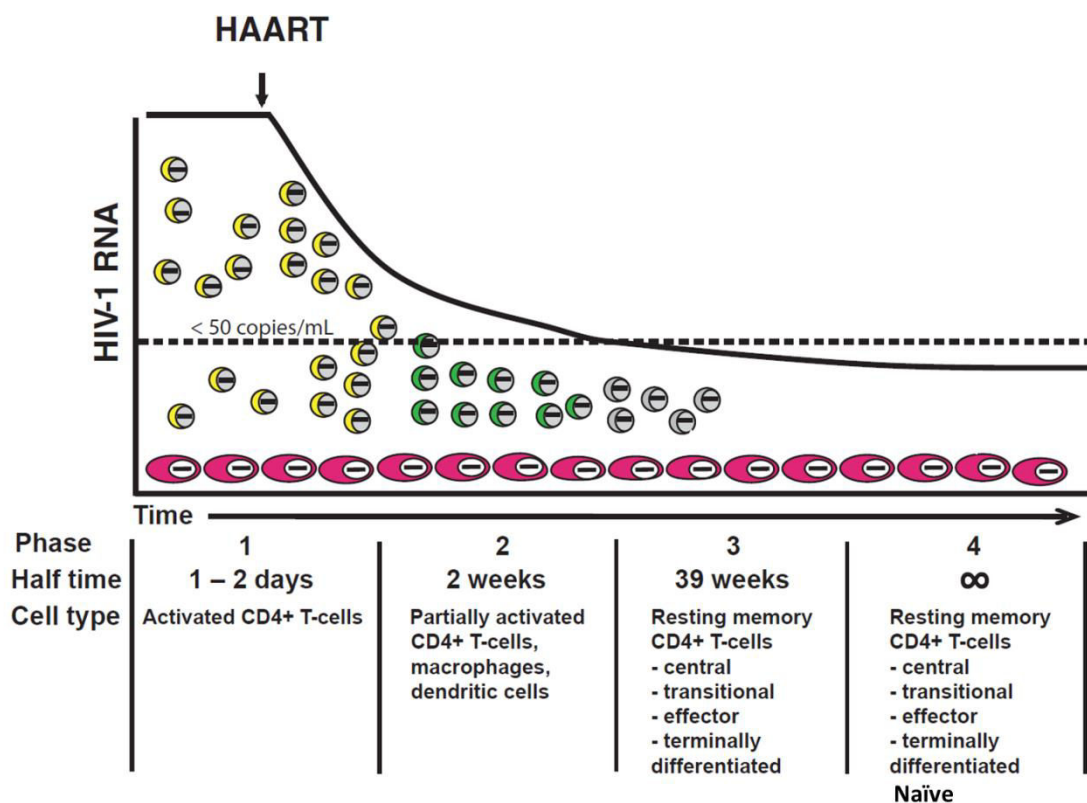


Figure 10 : Cinétique de décroissance de la production virale et populations cellulaires produisant des virions à chaque phase. Les cellules jaunes représentent les lymphocytes T CD4 activés, les verts T CD4 partiellement activés et autres types cellulaires, les bleues les T CD4 mémoires latentes et autres, les rouges les cellules à longue demi-vie tels les T CD4 mémoires et autres types cellulaires. D'après Palmer *et al* [454].

La première phase correspond à l'élimination du virus (10^{10} virus sont éliminés par jour) et à la lyse des lymphocytes T CD4 activés producteurs de virus (effet cytopathique virale, destruction par les défenses de l'hôte) ayant une demi-vie courte (1.6 jours) [43, 258].

Une deuxième phase, beaucoup plus lente correspond au *turn-over* des populations cellulaires infectées, T CD4 partiellement activés, macrophages, cellules dendritiques à demi-vie plus longue que les lymphocytes T CD4 activés (1 à 4 semaines) [43, 229, 258].

Une troisième phase de décroissance qui reflète la virémie résiduelle comporte une première partie avec des cellules infectées à demi-vie longue (39 semaines) suivi d'une **quatrième phase** où il n'y a pas ou peu de déclin de la charge virale qui se stabilise autour de 1 à 5 copies/ml (médiane à 3 copies/ml) avec des cellules à demi-vie extrêmement longue (quasiment infini selon le modèle de ce travail incluant les cellules mémoires centrales et transitionnelles). La définition des cellules et compartiments responsable de la persistance s'enrichit régulièrement avec l'identification de nouveaux acteurs.

Quelques études, essais randomisés et cohortes ont permis d'évaluer **l'impact sur le réservoir des trithérapies** en primo-infection. Ces études utilisaient pour la plupart, la quantification de l'ADN-VIH totale dans les PBMC par la technique ANRS, corrélée chez les patients traités à la quantification de l'ADN-VIH intégrée [458].

Chez des sujets inclus dans la cohorte PRIMO ANRS C06 et traités précocement par trithérapie, le taux d'ADN-VIH total chute significativement en moyenne de $-0,91 \log/10^6$ PBMC à 12 mois de traitement, à des niveaux plus bas que chez le patient chronique traité [456], et se rapprochant de celui des patients *HIV Controllers* [274, 282]. Dans l'essai ANRS 112 Interprim, on retrouve des résultats similaires à ceux de la cohorte PRIMO à savoir, une diminution du taux d'ADN-VIH de $-1,0 \log$ à M24 et de $-1,1 \log$ après 72 mois de traitement [459]. Le travail de Hocqueloux *et al.* comparant l'évolution du niveau d'ADN-VIH total dans les PBMC chez 307 patients présentant une charge virale contrôlée (<50 copies/ml) depuis plus de quatre ans voir dix ans pour certains patients (35 traités en primo-infection, 272 traités en phase chronique), a montré la régression du niveau de réplication virale et de la taille du réservoir significativement plus importante chez les patients traités en primo-infection. La cinétique de décroissance de l'ADN-VIH était biphasique et les niveaux d'ADN-VIH mesurés après 4 ans de suppression virale était plus basse dans le groupe des patients traités en primo-infection (médiane = $2,15$ versus $2,84 \log_{10}$ copies/10⁶ PBMC) avec un delta à 18 mois $-0,68$ versus $-0,43$ [376]. De plus ce bénéfice sur le réservoir était associé à une meilleure restauration immunitaire chez les patients avec un nombre de T CD4 $> 500/\text{mm}^3$ et un bon ratio CD4/CD8 au moment de l'initiation du traitement en primo-infection (Figure 11).

Sur un plus faible effectif, Buzon *et al.* ont rapporté les résultats d'une étude s'intéressant au réservoir chez 9 patients traités en primo-infection et comparés à des patients *Elite Controllers* (37 EC) suivis 10 ans et en succès virologique. Les niveaux d'ADN-VIH1 intégrés et non intégrés dans les PBMC étaient équivalents chez les EC et les patients traités en primo-infection mais significativement plus bas que chez les patients chroniques traités [460]. Ainsi, la diminution du réservoir est plus rapide en cas d'initiation d'un traitement précoce (demi-vie de 5 mois) que celle observée lors d'un traitement institué en phase chronique (demi-vie de 44 mois) [461], avec une diminution du nombre de cellules quiescentes infectées [462]. Par ailleurs il a été clairement démontré chez les patients traités en primo-infection [463, 464] et ceux traités au stade chronique [464] que l'ADN-VIH était corrélé à la virémie résiduelle dont le niveau est plus souvent bas chez les patients traités en

primo-infection que chez les patients traités en phase chronique [465]. Ces résultats soulignent le rôle du niveau de réservoir dans l'optimisation du contrôle de la réplication virale.

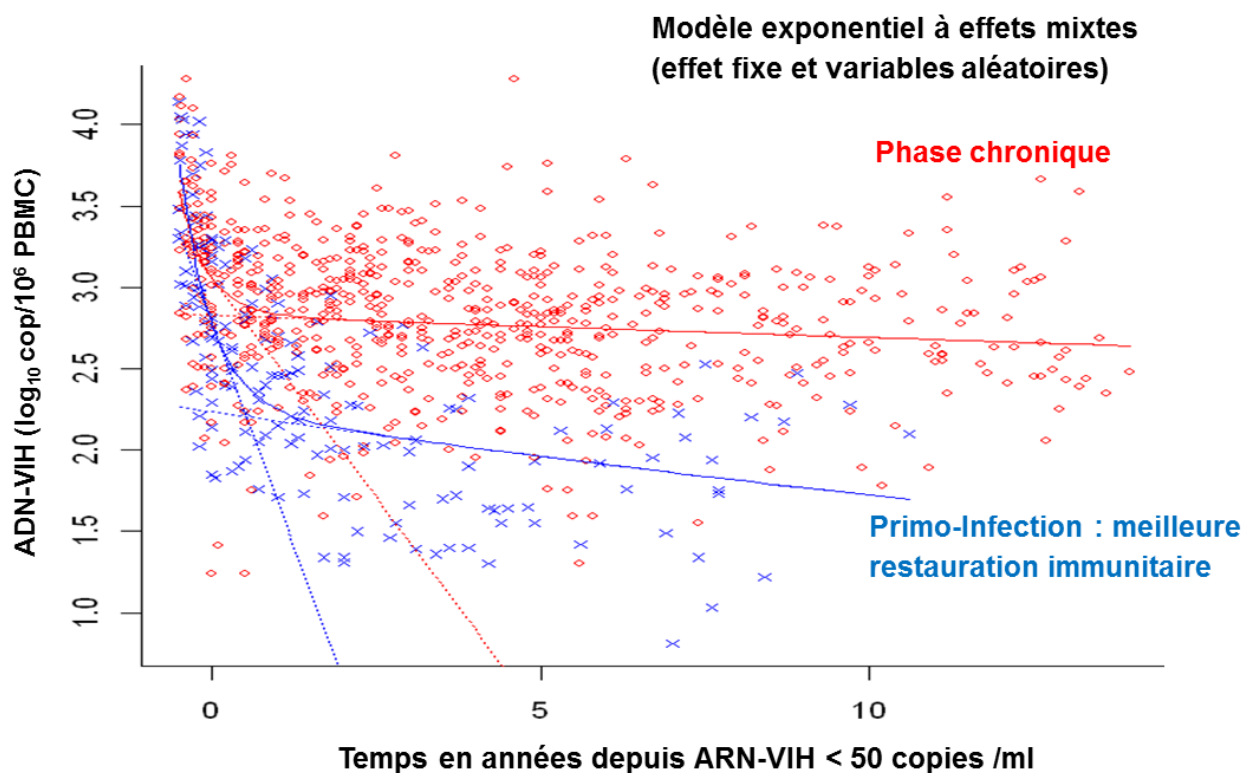


Figure 11 : Modélisation des réservoirs VIH sous traitement en primo-Infection et en phase chronique, d'après Hocqueloux *et al.* [376]. 235 patients traités en phase chroniques (points rouges), et 35 patients traités en primo-infection (points bleus). Le delta d'ADN pour les patients chroniques est de -0.51 (IQR : -0,24 à -0,90) et pour les patients en primo-infection -1.21 (-0,94 à -1,64).

D'autres études du réservoir sur un nombre restreint de patients retrouvent également un impact important sur le niveau de réservoir d'une trithérapie initiée précocement chez des patients en primo-infection quel que soit l'outil de mesure du réservoir, ADN-VIH total, intégré ou IUPM [230, 455, 466] et en comparaison avec des patients traités en phase chronique [455, 467].

Trois études récentes ont étudié l'impact d'une pentathérapie incluant le maraviroc et le raltégravir, associé à une trithérapie comportant deux Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) et un Inhibiteur de protéase IP ou un Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI).

En Thaïlande, Ananworanich *et al.* ont évalué l'impact sur un faible nombre de patients (n=15) diagnostiqués aux stades Fiebig I et II dans des populations exposées, de 6 mois d'une pentathérapie mais n'avait pas de bras contrôle avec une trithérapie. [408]. En Espagne, l'équipe de Picado *et al.* a évalué l'impact sur le réservoir d'un traitement de 48 semaines par emtricitabine/ténofovir plus raltégravir +/- maraviroc avec 15 patients par bras, incluent en médiane 4mois et demi après la contamination [468]. La plus récente, rapportée par Markowitz *et al.* aux USA, évaluait l'impact immuno-virologique d'une pentathérapie (raltégravir plus maraviroc) en association avec une combinaison d'IP et d'INTI variables selon les 34 patients inclus. Les patients étaient inclus à 48 jours de la primo-infection, avec une évaluation à 48 semaines et à 96 pour l'autre et une perte importante de sujets à ces points d'analyses [469]. L'ensemble de ces trois études n'ont pas permis de conclure définitivement de l'effet de la pentathérapie sur le réservoir des patients en primo-infection.

Un des éléments notables dans les différentes études randomisées et les cohortes s'intéressant au traitement en primo-infection VIH est la mise en évidence du fait que le contrôle viral partiel ou total, à plus ou moins long terme, pouvait être réalisé chez les patients traités au cours de la primo-infection et ayant interrompu le traitement [377, 381, 383, 470-472]. Le délai médian de rebond virologique était d'autant plus tardif que le traitement avait été initié précocement [473], avec un délai optimum pour certains auteurs, aux alentours de trois semaines post infection pour débiter le traitement [379, 472].

Le pourcentage de patients contrôleurs au long cours post arrêt de traitement est aux alentours de 10 % [381, 471, 474, 475] comparativement à 1 % de patients contrôlant spontanément leur charge virale en primo-infection [476]. Dans le travail rapporté par Laurent Hocqueloux *et al.* 5/32 (16 %) patients qui avaient débuté un traitement précocement en primo-infection, avec un délai médian de mise sous traitement 2,29 semaines [2-9,28] et ayant été traités pendant 4,97 ans [2,36-6,62], maintenaient une charge virale ARN-VIH <50 cop/ml pendant 6,4 ans [2,05-6,17] avec des taux d'ADN PBMC bas de 2 log/10⁶ PBMC, maintenus après arrêt. Dans cette étude [381], les patients ne présentaient pas les caractéristiques génétiques des patients *Elites Controllers* et des patients «long term non progressors» et

étaient tous traités longtemps et précocement. Dans la cohorte PRIMO, chez 14 patients qui présentaient un contrôle virologique post arrêt de traitement en médiane à 4.5 ans, l'ADN-VIH total mesuré dans les PBMC, ainsi que le niveau de T CD4 et l'ARN-VIH étaient retrouvés comme facteur prédictif de contrôle post arrêt de traitement [471]. Dans l'essai ANRS 100 Primstop, la décroissance du taux d'ADN-VIH en médiane est de $-1,1 \log/10^6$ et de $-1,5 \log/10^6$ PBMC chez les patients maintenant un contrôle immuno-virologique après arrêt de leur traitement [385].

Aussi, dans l'objectif de déterminer les facteurs associés à ce statut, a été mis en place le suivi de ces patients appelés aussi *Post Treatment Controllers* ou PTC dans la cohorte ANRS VISCONTI (pour *Viro-Immunologique Sustained Control after Treatment Interruption*). L'équipe a décrit 14 patients traités précocement à 1,6 [1,1-2,1] mois de la contamination pendant 36,5 mois en primo-infection et chez des PTC [475]. Ainsi, ces patients présentaient un réservoir particulièrement bas, des réponses spécifiques T CD8 faibles avec un niveau d'expression d'activation CD38 également diminué à la différence de celles observées chez les *HIV Controllers* (HIC) ou *Elite Controllers* (EC). Certaines de ces réponses sont associées à des allèles protecteurs de type HLA-B*5701, HLA-B*5703, HLA-B*27 fréquents chez les HIC [282, 477, 478] et peu fréquents chez les PTC. Cela suggère que les mécanismes de contrôle virologique ne sont probablement pas les mêmes entre les deux populations (figure 12).

La caractérisation du réservoir chez ces patients (non porteur d'allèles HLA protecteur) par quantification de la fréquence d'infection des sous populations lymphocytaires a mis évidence un profil similaire à celui des patients EC. Le contrôle virologique chez ces patients est associé à une protection des cellules TCM avec une fréquence d'infection moindre et une contribution moins importante au réservoir par rapport aux cellules plus différenciées. De plus, la contribution au réservoir des TTM est significativement plus importante que chez les EC [246] suggérant que l'homéostasie des réservoirs chez les patients Visconti (très liée à l'homéostasie lymphocytaire) est particulière et différente [475].

Un travail présenté à la *Conférence on Retrovirus and Opportunistic Infection (CROI 2013)* par Ananworanich *et al.* a également mis en évidence (par la mesure d'ADN-VIH intégré) un faible niveau d'infection des sous populations lymphocytaires de quelques patients traités en primo-infection. Dans ce travail les cellules TCM étaient moins infectées que chez les patients chroniques, dont nous savons que l'atteinte conditionne le niveau de progression vers le stade

SIDA [368]. Cette protection était d'autant plus importante que le traitement était initié précocement tendant vers des niveaux proches de ceux retrouvés chez des patients *HIV Controllers* (HIC) [479].

La protection des TCM comme élément clef du contrôle virologique a été mise en évidence dans les modèles simiens, chez le singe sooty-mangabey, un modèle naturel de résistance à la progression virale [480] et chez des singes traités précocement [481]. Cette protection des TCM suggère que l'impact bénéfique d'un traitement précoce se fait par une meilleure restauration du nombre de lymphocytes T naïfs pool de réserve de cellules à demi-vie longue, en lien avec une limitation de la fibrose du tissu réticulo-histiocytaire [288].

Très récemment, l'équipe de Persaud *et al.* a rapporté le cas isolé d'un enfant né de mère séropositive ayant bénéficié d'un traitement ultra précoce 30 heures après la naissance qui a été poursuivi pendant 18 mois puis arrêté fortuitement. A 24 mois, la quantification de l'ARN-VIH plasmatique permettait de retrouver 1 copie d'ARN-VIH/ ml, et un niveau d'ADN-VIH à 4,2 copies/10⁶ PBMC [482]. L'enfant ne présentait pas les allèles HLA de protection, ni le polymorphisme protecteur du gène codant pour le corécepteur CCR5, ce qui en fait un cas très similaire aux patients VISCONTI.

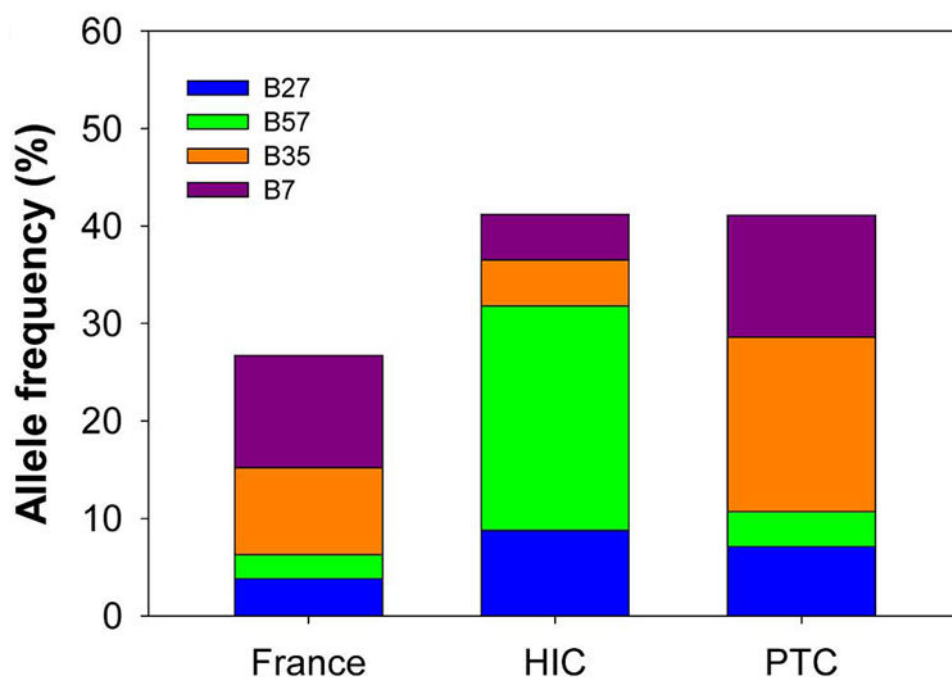


Figure 12 : Fréquences des allèles de protection HLA-B*27 et 57 et les allèles de risque de progression de l'infection HLA-B*07 et B*35, dans la population générale française, chez des patients *HIV Controllers* et chez les patients VISCONTI [475].

3.2.2. Impact du traitement sur les cellules du tissu lymphoïde de la muqueuse digestive (GALT)

Les études réalisées à ce jour ont montré que près de 60 % des lymphocytes de la *lamina propria* du tube digestif étaient détruits dans les trois premières semaines de l'infection [198, 199, 483], ceci étant particulièrement lié à l'expression massive du récepteur CCR5+ sur ces lymphocytes [34, 201, 484], en particulier dans les populations mémoires TCM, TTM, TEM tant chez l'homme que chez le singe [202, 324]. La reconstitution de ce compartiment lymphocytaire T CD4, induite par une trithérapie précoce apparaît alors insuffisante et inférieur à celle observée au niveau du sang [200, 483].

Une seule étude, non randomisée, a évalué l'impact de 24 semaines d'une **pentathérapie** (tenofovir/emtricitabine/efavirenz/raltegravir/maraviroc), sur le niveau de réservoir dans des cellules de biopsie colique (mesuré par quantification de l'ADN-VIH total et intégré) chez un faible nombre de patients (7) en primo-infection (stades Fiebig I à III). Le traitement permettait une diminution significative de la fréquence d'infection des cellules réservoirs. Cette diminution était associée à une diminution de l'activation T CD8 et une restauration du nombre de TEM et TCM de la muqueuse [408]. Chez les patients chroniques traités, le bénéfice sur l'activation a également été décrit et était associé à une restauration de l'épithélium intestinal avec limitation des translocations bactériennes [485], en revanche le traitement aurait peu d'impact sur le réservoir situé dans le GALT [327, 332, 486].

Des résultats expérimentaux dans les modèles de primates infectés par le SIV suggèrent qu'un traitement ultra-précoce (<7 jours dans cette étude) permet une bonne restauration des T CD4 de la muqueuse intestinale via la multiplication des cellules TCM [487] et est associée à une régénération de l'épithélium intestinal [488]. Une évaluation plus fine d'un traitement ultra précoce par deux inhibiteurs nucléosidiques (à 7 jours de la contamination) *versus* l'absence de traitement a pu être réalisée dans une étude sur des modèles simiens. Les auteurs ont mis en évidence une régression du réservoir digestif (ADN-VIH) après seulement 35 jours de traitement, mais une absence de diminution de l'activation et une persistance de la réplication virale *in situ*. Le non bénéfice sur l'activation dans ce modèle peut être lié à l'activation majeure retrouvée en primo-infection, à l'utilisation d'une bithérapie, à la mauvaise diffusion des ARV dans le tissu gastro-intestinal [489] et au temps court de traitement dans cette étude.

Ces résultats suggèrent qu'il est possible qu'un traitement précoce modifie la fréquence d'infection des différentes sous-populations lymphocytaires infectées circulantes et tissulaires ce qui pourrait être expliqué par un blocage de l'infection de nouvelles cellules et par la mort rapide et progressive des cellules infectées [461]. Cela permettrait aussi de réduire le réservoir à un bas niveau, lequel est nécessaire pour un meilleur contrôle de la réplication virale en post arrêt de traitement, offrant ainsi des perspectives de rémission soutenue à long terme.

Conclusion

Les conséquences de l'infection par le VIH-1 sont non seulement la destruction des lymphocytes T CD4, mais aussi une perturbation majeure de l'homéostasie lymphocytaire associée à une activation immunitaire massive et à l'établissement du réservoir viral en primo-infection. Ces réservoir cellulaires et tissulaires diffus, sont riches en cellules cibles quiescentes du VIH pour lesquelles le système immunitaire reste aveugle. Leur durée de vie, leur niveau d'activation et de prolifération, et l'incapacité des antirétroviraux actuels à atteindre ces cellules infectées latentes, conditionnent la persistance virale à long terme.

Prenant en compte l'ensemble de ces connaissances sur la primo-infection, nous avons élaboré l'essai thérapeutique **OPTIPRIM** en incluant un certain nombre d'études physiopathologiques, dont certaines font l'objet de travaux dans cette thèse.

Deuxième partie : TRAVAUX

1. Rationnel de l'essai OPTIPRIM

Cet essai est basé sur l'hypothèse qu'un traitement puissant initié précocement en primo-infection peut réduire le réservoir de cellules CD4 infectées tout en préservant l'infection de cellules mémoires à longue durée de vie, un des acteurs clefs de l'homéostasie lymphocytaire. Cela protégera le système immunitaire des effets délétères de l'hyperactivation immune généralisée et de son atteinte progressive par l'infection virale.

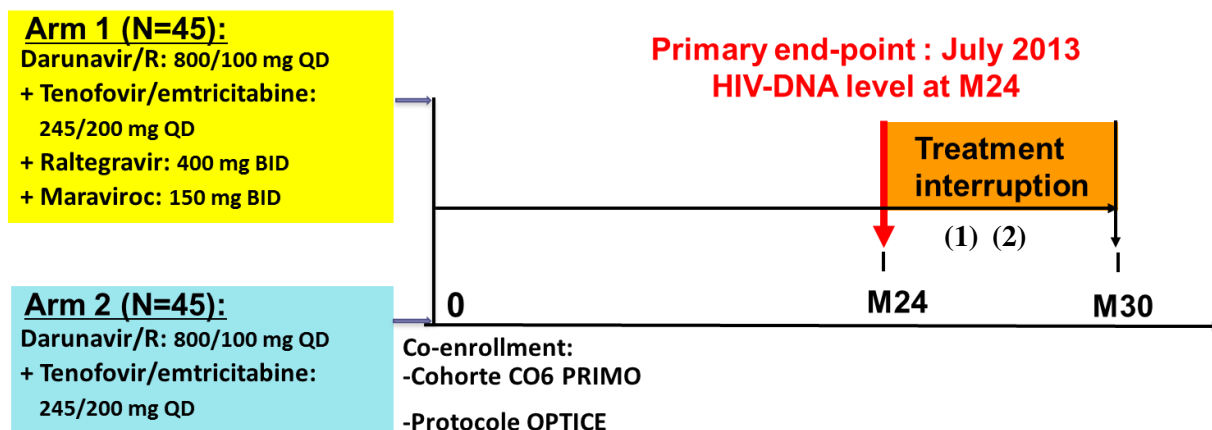
Le réservoir de cellules infectées s'établit très tôt dans l'infection et bon nombre de lymphocytes sont rapidement détruits; cependant, une faible proportion retourne à l'état quiescent en ayant intégré le génome viral. La primo-infection est un moment particulier dans la constitution du réservoir, car l'infection virale n'est pas à son état d'équilibre. Par ailleurs, les mêmes traitements sont recommandés en primo-infection ou en phase chronique alors que les niveaux de réservoirs sont nettement plus élevés en primo-infection. En primo-infection, le niveau du réservoir est différent de celui présent au stade chronique, du fait d'une moindre proportion de cellules mémoires spécifiques infectées. Intervenir tôt dans l'infection pourrait modifier la dynamique de l'établissement de certains réservoirs cellulaires ou tissulaires à très longue durée de vie, tout en préservant les capacités de réponses immunes spécifiques et non spécifiques.

A partir de ces hypothèses nous avons mis en place l'essai **OPTIPRIM ANRS047**. C'est un essai, randomisé, multicentrique, dont l'objectif principal est d'évaluer l'impact sur les réservoirs, d'un traitement de 24 mois comprenant une combinaison (pentathérapie) comprenant soit dans le bras 1 du raltégravir pour son effet antiviral puissant, du maraviroc pour son impact sur les lymphocytes T CD4 et son rôle antiviral et du darunavir/ritonavir (r) associés à emtricitabine/ténofovir, soit dans le bras 2 du darunavir/ritonavir associés à emtricitabine/ténofovir. Cet essai a recruté 90 patients en 16 mois dans 47 centres entre Avril 2010 à Juillet 2011, pour atteindre le critère de jugement principal en Juillet 2013.

ANRS 147 OPTIPRIM

Essai randomisé multicentrique de phase III évaluant chez des patients en primo-infection VIH-1 l'impact sur les réservoirs (par quantification de l'ADN-VIH-1 dans les PBMC) d'un traitement de 24 mois comprenant soit raltégravir, maraviroc, darunavir/ritonavir associés au Truvada[®] (emtricitabine/ténofovir), soit darunavir/ritonavir associés au Truvada[®].

- **Promoteur** : ANRS
- **Début des pré- inclusions** : mars 2010
- **Investigateur coordonnateur** : A. Chéret (Hôpital DRON Tourcoing)
- **Virologie** : C. Rouzioux (Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris)
- **Immunologie** : A. Venet (Inserm U1012, Le Kremlin Bicêtre)
B. Autran (Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris),
- **Méthodologie, statistique** : L. Meyer, G. Nembot (Inserm U1018, Le Kremlin Bicêtre)



(1) Critères d'arrêt de traitement : ARN-VIH < 50 cp/ml et CD4 \geq 500 /mm³ ou \geq 30 %

(2) Critères de reprise de traitement : ARN-VIH \geq 50 000 cp/ml ou CD4 < 500/mm³ et < 30 %

Critère principal de jugement :

Le critère de jugement principal est la comparaison des niveaux d'ADN-VIH dans les lymphocytes circulants du sang périphérique après deux ans de traitement.

Critères secondaires de jugement :

- ***Critères virologiques et immunologiques:***

- Comparer les moyennes d'ARN-VIH entre les deux bras à M30 (6 mois après l'arrêt du traitement)
- Comparer les niveaux d'ARN-VIH plasmatique entre les deux bras à J14, M1, M3, M6, M12, M18, M24, M25, M26, M28
- Comparer les pourcentages de patients avec ARN-VIH < 50 copies/mL à J14, M1, M3, M6, M12, M18, M24, M25, M26, M28 et M30 entre les deux bras
- Comparer les pourcentages de patients avec ARN-VIH < 5 copies/mL à M24
- Comparer les niveaux d'ADN-VIH par million de PBMC et par million de CD4. Comparer les pourcentages de patients ayant un ADN-VIH < 70 copies/million de PBMC à J14, M1, M3, M6, M12, M18, M24 M26 et M30 entre les deux bras
- Comparer les taux et les pourcentages de CD4 et de CD8 à J14, M1, M3, M6, M12, M18, M24, M25, M26, M28 et M30 entre les deux bras
- En cas d'échec virologique, estimer le nombre et le type de mutations de résistance sur les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse, et/ou de l'intégrase. Rechercher une évolution du tropisme vers une souche X4 et en fonction des données de la littérature une mutation impliquant le maraviroc

- ***Critères cliniques :***

- Progression de l'infection VIH définie par la survenue des événements cliniques de stade B ou C et par la survenue de décès entre J0 et M30
- Tolérance des traitements de l'essai : comparaison entre les deux bras
 - Nombre, nature et délai de survenue des événements indésirables (La sévérité des événements indésirables est appréciée à partir de l'échelle ANRS de cotation du degré des événements indésirables)
 - Evolution des troubles métaboliques cliniques et biologiques
 - Evaluation des symptômes ressentis
- Observance du traitement qui est évaluée d'une part à partir d'un auto questionnaire rempli par le patient et d'autre part, suivant les données reportées sur le cahier de dispensation, par la pharmacie du centre permettant de calculer par patient le nombre d'unités dispensées et le nombre d'unités non utilisées
- Fréquence des modifications ou arrêts de traitement

- ***Autre analyse***

- Recherche de marqueurs prédictifs du taux d'ADN-VIH <70 copies/million de PBMC à M24
- Recherche de marqueurs prédictifs du taux d'ARN-VIH après arrêt

Critères d'inclusion :

- Age ≥ 18 ans à la visite de pré inclusion
- Patients en primo-infection VIH-1 aiguë ou récente
 - Infection aiguë définie par la présence d'un Elisa VIH-1 négatif ou faiblement positif, avec Western blot VIH-1 négatif ou incomplet (≤ 1 Anticorps) et ARN-VIH positif et/ou Ag p24 positif
 - Infection récente définie par la présence d'un Elisa VIH-1 positif avec Western blot VIH-1 incomplet (≥ 2 et < 5 anticorps avec présence de l'anticorps anti-p24 associé à l'anticorps anti-gp160 ou anti-gp120 ou anti-gp41) et ARN-VIH positif
- Primo-infection symptomatique ou $CD4 < 500/mm^3$
- Consentement libre, éclairé et écrit, signé par le patient et l'investigateur au plus tard le jour de la pré inclusion et avant tout examen nécessité par l'essai
- Patient affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale
- Les patients des études complémentaires virologiques et immunologiques doivent être suivis dans un centre choisi pour y participer, accepter les contraintes de prélèvements supplémentaires

Critères de non-inclusion :

- Patient porteur d'une souche virale VIH-2 isolée
- Patient ayant reçu à titre prophylactique un traitement antirétroviral après une exposition au VIH dans les 6 mois précédant l'inclusion
- Femme en âge de procréer sans contraception efficace (stérilet et préservatif)
- Femme enceinte ou allaitant
- Infection opportuniste classant SIDA en dehors de la candidose œsophagienne
- Patient porteur de l'antigène HBs.
- Cirrhose décompensée (Stade B et C de score de Child et Pugh)
- Pathologie néoplasique en cours de traitement par chimio et/ou radiothérapie
- Co-administration de traitements interdits
- ASAT, ALAT ou bilirubine ≥ 10 fois la limite supérieure de la normale
- TP $< 50\%$
- Clairance de la créatinine < 60 mL/mn
- Nombre de plaquettes $< 25\,000/mm^3$
- Personne placée sous sauvegarde de justice
- Patient participant à une autre recherche évaluant d'autres traitements comprenant une période d'exclusion toujours en cours à la pré-inclusion

Aspects statistiques – Calcul du nombre de sujets nécessaires :

- **Hypothèses :** $\alpha=0,05$ $1-\beta=0,80$ - Test bilatéral
- **Critère : Comparaison entre les 2 bras des niveaux d'ADN-VIH ($\log/10^6$ PBMC)**
On attend une différence minimale entre les moyennes d'ADN-VIH de **$0,5 \log/10^6$ PBMC** entre les deux bras de traitement
- **Le nombre de sujets nécessaires est de 45 patients par bras.**
- **Soit un total de 90 patients.**

Article I

Early Spread of a Single HIV-1 Cluster and Skewed Immune Homeostasis Drive the Establishment of the HIV Reservoir within One Month Post-Infection

Antoine Chéret*, Charline Bacchus*, Véronique Avettand-Fenoël, Georges Nembot, Adeline Mélard, Catherine Blanc, Caroline Lascoux-Combe, Laurence Slama, Thierry Allegre, Clotilde Allavena, Yazdan Yazdanpanah, Claudine Duvivier, Christine Katlama, Cécile Goujard, Bao Chau Phung Seksik, Anne Leplatois, Jean-Michel Molina, Laurence Meyer, Brigitte Autran, Christine Rouzioux, and the **OPTIPRIM ANRS 147 study group**

*Ces auteurs ont contribué également à la rédaction du manuscrit

Article publié dans le journal *PLOS One*. May 2013 ; 8(5): e64219.

Poster présenté à l'ICAAC, september 2012, Abstract H-1568

Présentation orale, RICAI décembre 2012, Physiopathologie de la Primo-Infection VIH

Objectifs

L'objectif thérapeutique actuel est de limiter la taille du réservoir et de préserver le compartiment T CD4 dès que possible après la primo-infection. Cet objectif nécessite une meilleure compréhension des caractéristiques de la distribution précoce du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires. Nous avons évalué, en coopération avec l'équipe d'Immunologie du Professeur Brigitte Autran à l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière (INSERM UMR-S945) chez douze patients traités en primo-infection dans le cadre de l'essai OPTIPRIM, dans les sous-populations lymphocytaires T CD4 quiescentes et dans les cellules triées de biopsies rectales pour 3 d'entre eux (T CD4 rectaux et cellules mononuclées rectales), la diversité virale et leur niveau d'infection par quantification de l'ADN-VIH total dans les PBMC (amorces de la région LTR du génome viral, Biocentric Bandol, France). Nous avons également déterminé la capacité répliquative de ces virus et de certains signaux inducteurs qui y sont associés, puis évalué les perturbations de l'homéostasie lymphocytaire T CD4.

Principaux résultats :

Les 12 patients étudiés ont été inclus précocement dans l'essai **OPTIPRIM**, en médiane 36 jours après la contamination et présentaient une grande fréquence d'infection avec un niveau d'ADN-VIH= 3,9 log copies /10⁶ PBMC et de répliquaison avec ARN-VIH= 5,4 log copies par ml de plasma et une chute des lymphocytes T CD4 en médiane à 376 cellules/mm³. 11/12 étaient symptomatiques au moment du recrutement de l'essai. L'étude phylogénétique par clonage en dilution limite a permis l'identification de clones viraux à tropisme CCR5 appartenant à un seul cluster homogène pour chaque patient, dans le plasma sanguin, dans les T CD4 et les sous-populations lymphocytaires périphériques, dans les T CD4 rectaux et les cellules mononuclées rectales. Seul un patient présente des clones viraux appartenant à deux clusters différents mais qui sont phylogénétiquement proches, l'un étant retrouvé exclusivement dans le plasma, l'autre étant à la fois dans le plasma et dans certaines sous-populations lymphocytaires.

L'infection des sous-populations mémoires centrales (TCM), transitionnelles (TTM) et effectrices (TEM) est massive et à des niveaux équivalents mais dix fois supérieur à celle des lymphocytes naïfs (TN). Par ailleurs, l'homéostasie lymphocytaire est perturbée avec une diminution de la fréquence des TN, TCM au profit des cellules les plus différenciées TTM et

TEM. La fréquence d'infection et la répartition ont permis d'estimer la contribution (en prenant en compte le niveau d'infection de chaque sous-population et la fréquence de chaque sous-population parmi les T CD4 quiescents) de chaque sous-population au réservoir lymphocytaire. L'activation *in vitro* de chaque sous-population lymphocytaire induit une production virale, particulièrement à partir des TN en présence d'IL7. Une production virale spontanée sans stimulation est aussi mise en évidence mais à des niveaux inférieurs. La cinétique de production est variable selon la nature, la durée du stimulus et le stade de différenciation des sous populations. Ces fractions lymphocytaires sont donc infectées par des virus inductibles.

Discussion

Cette étude est la première à évaluer aussi précocement en primo-infection les caractéristiques phylogénétiques du virus transmis et sa répartition dans le réservoir T CD4 quiescent à l'instar d'une étude qui s'était intéressée au niveau d'infection dans les sous populations lymphocytaires T CD4, 225 jours après la séroconversion [17]. Aussi, un seul cluster de tropisme R5 est rapidement disséminé dans toutes les sous-populations lymphocytaires T CD4 dans le mois suivant la contamination et cela indépendamment de leur état d'activation et de différenciation.

L'infection des cellules TN contraste avec leur faible expression du CCR5 et remet en cause le dogme de leur infection préférentielle par des souches restreintes par le CXCR4. La présence d'un cluster viral homogène dans les compartiments étudiés résulte très probablement de la production à partir d'un variant viral non diversifié comme rapporté dans les 6 mois suivant l'infection [26]. Les faibles niveaux d'activation des sous-populations lymphocytaires et la production spontanée *in vitro* à partir de toutes les sous-populations lymphocytaires T CD4 met l'accent sur l'hypothèse que ce réservoir pourrait ne pas encore représenter un réservoir latent à ce stade précoce de l'infection, mais présente toutes les caractéristiques pour le devenir.

Ainsi les T CD4 mémoires représentent la plus grande contribution et particulièrement les TTM parmi les cellules T CD4 quiescentes infectées présentant un faible niveau d'activation et contribuent massivement au pool de cellules infectées dans les PBMC.

La contribution des cellules TTM au réservoir est majeure, à la différence de ce qui est observé en phase chronique de l'infection où les cellules TCM contribuent majoritairement [245].

En conclusion, nous avons démontré que dans le mois suivant l'infection, un seul cluster viral restreint par le CCR5 est disséminé et infecte massivement les diverses fractions lymphocytaires T CD4. Les sous-populations lymphocytaires naïves et centrales mémoires à longue durée de vie représentent une petite partie du compartiment de cellules T CD4 infectées, alors que la contribution des cellules transitionnelles mémoires et des effectrices mémoires au réservoir est importante. Ces éléments pourraient être un reflet des perturbations précoces de l'homéostasie lymphocytaire lors la primo-infection, du fait d'un haut niveau d'activation en pleine tempête cytokinique.

A Single HIV-1 Cluster and a Skewed Immune Homeostasis Drive the Early Spread of HIV among Resting CD4+ Cell Subsets within One Month Post-Infection

Charline Bacchus^{1,2*}, Antoine Cheret^{3,4*}, Véronique Avettand-Fenoël³, Georges Nembot⁵, Adeline Mélard³, Catherine Blanc⁶, Caroline Lascoux-Combe⁷, Laurence Slama⁸, Thierry Allegre⁹, Clotilde Allavena¹⁰, Yazdan Yazdanpanah⁴, Claudine Duvivier¹¹, Christine Katlama¹², Cécile Goujard¹³, Bao Chau Phung Seksik¹⁴, Anne Leplat¹⁵, Jean-Michel Molina¹⁶, Laurence Meyer⁵, Brigitte Autran^{1,2*}, Christine Rouzioux³, for the OPTIPRIM ANRS 147 study group[¶]

1 Pierre-and-Marie-Curie University Paris 06, Laboratory Immunity and Infection UMR_S 945, F-75013, Paris, France, **2** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Laboratory Immunity and Infection UMR_S 945, F-75013, Paris, France, **3** Paris-Descartes University, Sorbonne Paris-Cité, EA 3620, Virology Laboratory, Necker Enfants-Malades Hospital, Paris, France, **4** Infectious Diseases Department, Gustave Dron Hospital, Tourcoing, France, **5** Epidemiology and Public Health Department, Inserm U1018, Le Kremlin-Bicêtre Hospital, Paris, France, **6** CyPS Flow Cytometry Platform, Pierre & Marie Curie University, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France, **7** Infectious Diseases Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Saint-Louis Hospital, Paris, France, **8** Infectious Diseases Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Tenon Hospital, Paris, France, **9** Department of Hematology, Aix-en-Provence Hospital, Aix-en-Provence, France, **10** Infectious Diseases Department, Hôtel-Dieu Hospital, Nantes, France, **11** Pasteur Institute, Medical Center, Necker-Pasteur Infectious Diseases Center, Paris, France, **12** Infectious Diseases Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France, **13** Internal Medicine and Infectious Diseases Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre Hospital, Paris, France, **14** Infectious Diseases Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Bichat Hospital, Paris, France, **15** Infectious Diseases Department, L'Archet Hospital, Nice, France, **16** Sorbonne Paris-Cité University, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U941, Infectious Diseases Unit, Saint-Louis Hospital, Paris, France

Abstract

Optimizing therapeutic strategies for an HIV cure requires better understanding the characteristics of early HIV-1 spread among resting CD4+ cells within the first month of primary HIV-1 infection (PHI). We studied the immune distribution, diversity, and inducibility of total HIV-DNA among the following cell subsets: monocytes, peripheral blood activated and resting CD4 T cells, long-lived (naïve [TN] and central-memory [TCM]) and short-lived (transitional-memory [TTM] and effector-memory cells [TEM]) resting CD4+ T cells from 12 acutely-infected individuals recruited at a median 36 days from infection. Cells were sorted for total HIV-DNA quantification, phylogenetic analysis and inducibility, all studied in relation to activation status and cell signaling. One month post-infection, a single CCR5-restricted viral cluster was massively distributed in all resting CD4+ subsets from 88% subjects, while one subject showed a slight diversity. High levels of total HIV-DNA were measured among TN (median 3.4 log copies/million cells), although 10-fold less ($p = 0.0005$) than in equally infected TCM (4.5), TTM (4.7) and TEM (4.6) cells. CD3 – CD4+ monocytes harbored a low viral burden (median 2.3 log copies/million cells), unlike equally infected resting and activated CD4+ T cells (4.5 log copies/million cells). The skewed repartition of resting CD4 subsets influenced their contribution to the pool of resting infected CD4+ T cells, two thirds of which consisted of short-lived TTM and TEM subsets, whereas long-lived TN and TCM subsets contributed the balance. Each resting CD4 subset produced HIV *in vitro* after stimulation with anti-CD3/anti-CD28+IL-2 with kinetics and magnitude varying according to subset differentiation, while IL-7 preferentially induced virus production from long-lived resting TN cells. In conclusion, within a month of infection, a clonal HIV-1 cluster is massively distributed among resting CD4 T-cell subsets with a flexible inducibility, suggesting that subset activation and skewed immune homeostasis determine the conditions of viral dissemination and early establishment of the HIV reservoir.

Citation: Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, Nembot G, Mélard A, et al. (2013) A Single HIV-1 Cluster and a Skewed Immune Homeostasis Drive the Early Spread of HIV among Resting CD4+ Cell Subsets within One Month Post-Infection. PLoS ONE 8(5): e64219. doi:10.1371/journal.pone.0064219

Editor: Derya Unutmaz, New York University, United States of America

Received: February 22, 2013; **Accepted:** April 10, 2013; **Published:** May 14, 2013

Copyright: © 2013 Bacchus et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the National French Agency on AIDS Research (Agence Nationale de Recherche sur le Sida, <http://www.anrs.fr/>), and supported by Merck Sharp & Dohme, Jansen, ViiV Healthcare and Gilead. C. Bacchus received a predoctoral fellowship from Pierre and Marie Curie University. The funders and supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The OPTIPRIM Agence Nationale de Recherche sur le Sida 147 study had received funding from Merck Sharp & Dohme, Jansen, ViiV Healthcare and Gilead. These companies contributed to the OPTIPRIM sub-studies. This commercial source of funding did not alter the authors' scientific guidance and production of results, nor the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: brigitte.autran@psl.aphp.fr

¶ These authors contributed equally to this work.

¶ The members of the OPTIPRIM ANRS 147 study group can be found in the Acknowledgments.

Introduction

The major obstacle to finding a cure to HIV infection lies in the persistence of the latent HIV reservoir. The reservoir is defined as a cell type or anatomical site in association with which a latent replication-competent form of the virus accumulates, persists and is able to produce infectious viral particles [1,2]. Growing knowledge about HIV reservoirs indicates the need to limit reservoir size and preserve the CD4 compartment as early as possible after infection. This objective requires a better understanding of the characteristics of the virus' early distribution among the various CD4+ cell subsets, and particularly the resting CD4 T-cell subsets that mainly host the reservoir.

The magnitude and kinetics of the sequence of events occurring in primary HIV-1 infection (PHI) is a strong predictor of the infection's subsequent progression [3]. Usually, a single CCR5-restricted viral clone, or a very limited number of clones, is transmitted and able to develop a productive systemic infection, while any other viruses penetrating the mucosal barriers are generally considered defective or less fit [4,5]. PHI is characterized by an exponential increase of viral production [6], together with a massive and systemic depletion of CD4 T cells, with 30 to 60% of the memory CD4+ T cells infected and dying within a few days throughout the body, especially in the gut-associated lymphoid tissues [7,8]. The cytokine storm associated with symptomatic PHI certainly plays a role in this rapid systemic dissemination throughout the immune system, and a viral setpoint is established between 21 to 28 days post-infection [6], while homeostatic cytokines compensate for this global CD4 cell depletion [9]. HIV-1 provirus integration into the genome of CD4+ cells enables viral persistence [10,11] and the establishment of a latent reservoir in the highly heterogeneous CD4 cell compartment. However, little is known about the early characteristics and kinetics of the virus' systemic dissemination in patients, specifically its distribution among the various CD4 cell subsets within the first month post-infection.

While infected T cells and macrophages were detected in patients' axillary and inguinal lymph nodes within days from first symptoms [12], the failure of early HAART to prevent the generation of latently infected resting CD4 T cells [13] suggests that these HIV reservoirs are established very rapidly after infection. Also, the later the Fiebig classification stage [14], the higher the frequency of infected CD4 T cells was [15], with the naive and the total memory CD4 compartments massively infected from the early stages II/III [16]. Indeed, in one cohort study of late PHI at a median 225 days from estimated seroconversion date, the HIV-DNA content was huge in all four CD4 subsets, that is, naive (TN) and central (TCM), transitional (TTM) and effector (TEM) memory cells, regardless of their activation status; infection level was significantly higher in TEM than in the other three subsets [17].

In order to better define the kinetics of HIV dissemination among activated and resting CD4 T-cell subsets in early PHI, we have investigated the spread of total HIV-DNA among those various resting cells from twelve subjects included at a median 36 days post-infection in the OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial. We also analyzed the influence of viral diversity, CD4 T-cell homeostasis and activation on the characteristics of the early virus dissemination as well as the ability of immune signals, IL-7 in particular, to reactivate the virus in those resting CD4 T cells. We showed a massive spread of total HIV-DNA within all resting naive and memory CD4 subsets a month after infection, with only one viral cluster circulating throughout the blood and the rectal compartments. Furthermore, we demonstrated the capacity of

each resting CD4 subset to produce HIV upon *in vitro* stimulation over a 13-day long culture, suggesting a clear role for those cells in hosting the early HIV reservoirs.

Results

Characteristics of Acutely Infected Individuals

This report analyzes twelve subjects included at a median of 36 days [30–41] after infection, eleven of whom presented clinical symptoms (Table 1). Ten subjects (83%) were male, and eleven (92%) were infected by sexual contacts, either homosexual for six subjects (MSM, 50%), heterosexual for three (HTS, 25%) or bisexual for two (MSM/HTS, 17%). Only one subject (8%) was infected by a needle accident unrelated to drug abuse. At pre-infection (8 days maximum before inclusion), western blot assays showed no antibodies for two subjects (17%), 2 antibodies for one subject (8%), 3 antibodies for eight subjects (67%) and 4 antibodies for the last subject (8%). The median CD4 cell count was 376 CD4/mm³ [341–516] with a CD4/CD8 ratio of 0.3 [0.2–0.9]. Median plasma HIV-RNA was 5.4 log copies/ml [5.0–5.8], and total HIV-DNA was 3.9 log copies/million PBMC [3.5–4.3]. All study participants were infected by a CCR5-restricted viral strain, with B and non-B subtypes in nine and three cases respectively. Four subjects carried the HLA B*35 allele associated with disease progression, and none had any HLA alleles associated with HIV-1 protection (i.e., HLA B*27 and B*57) [18].

HIV Massively Spread among All CD4+ Subsets during Acute PHI and was Mainly Distributed in Resting Memory CD4 T-cell Subsets

The distribution of total HIV-DNA was quantified in various sorted populations from PBMCs. We compared this distribution in the following cell subsets: total, activated (CD25+CD69+HLADR+) and resting (CD25–CD69–HLADR–) CD3+CD4+ T cells, CD3–CD4+ monocytes, and live resting CD3+CD4+ subsets, namely TN, TCM, TTM and TEM, from the twelve subjects with PHI (Figure 1). A detailed cell sorting scheme is shown in (Figure S1). Total HIV-DNA was detected in all 12 subjects' PBMCs and CD4 T-cell samples, but only in 5/10 available monocyte samples, the CD4 T cell compartment being predominantly infected compared to other cell populations. Accordingly, CD3+CD4+ T cells were ten times richer in HIV-DNA than total PBMCs (median 4.5 [4.0–4.7] versus 3.3 [2.9–3.6] log HIV-DNA copies/million cells, $p=0.0005$). In contrast, the infection level was lower in CD3–CD4+ monocytes, which harbored a median estimated 2.3 log HIV-DNA copies/million monocytes [2.2–2.7]. Note that infection levels did not differ between activated and resting CD4+ T cells (median 4.5 [3.5–4.9] versus 4.5 [4.0–4.7] log copies/million cells respectively).

We next analyzed the distribution of total HIV-DNA among the four resting CD4 T-cell subsets, which were all highly infected. The TN compartment contained a median of 3.4 log copies/million cells [3.0–3.9], even though its infection level was one tenth that of all resting memory CD4 subsets ($p=0.0005$), which contained equivalent levels of HIV-DNA (medians: TCM: 4.5 [4.1–5.0], TTM: 4.7 [4.5–5.2], and TEM: 4.6 [4.3–4.9] log copies/million cells). As it is generally accepted that infected CD4 T cells harbor only one HIV-DNA molecule [19], we can extrapolate the numbers of infected cells from the measured infection levels. These results suggest very high frequencies of infected cells in all studied cell subsets, up to 3% infected TN cells to 20% infected memory CD4 T cells.

Table 1. Characteristics of the 12 study participants with acute HIV-1 infection at inclusion.

Subject Code	Sex	Age (years)	Symptomatic Primary HIV-1 Infection	Number of Days from Infection	Mode of HIV Transmission	Number of Anti-HIV-1 Antibodies (Western Blot)	CD4 Count (/mm3)	CD4/CD8 Ratio	HIV-RNA (log copies/ml)	HIV-DNA (log copies/Million PBMCs)	Viral Tropism	Viral Subtype	HLA B(1)	B(2)
1	M	32	Yes	30	MSM	0	163	0.3	>7	4.5	CCR5	B	35	51
2	M	24	No	32	MSM	3	381	0.2	6.5	3.9	CCR5	CRF02	39	44
3	W	24	Yes	35	HTS	0	653	1.3	5.4	3.2	CCR5	B	40	76
4	M	23	Yes	55	MSM	3	332	0.2	5.4	4.0	CCR5	B	08	50
5	M	20	Yes	36	MSM	3	185	0.4	5.0	3.9	CCR5	B	35	47
6	W	56	Yes	27	HTS	3	370	0.2	5.2	3.2	CCR5	C	35	48
7	M	28	Yes	37	MSM/HTS	3	370	0.1	5.7	3.7	CCR5	B	18	50
8	M	32	Yes	26	MSM	3	708	0.1	5.9	3.5	CCR5	B	13	60
9	M	39	Yes	31	MSM/HTS	3	530	1.0	3.2	4.3	CCR5	B	08	44
10	M	47	Yes	38	MSM	3	368	0.2	5.7	3.6	CCR5	B	37	51
11	M	62	Yes	44	HTS	4	473	1.1	5.3	4.3	CCR5	A	44	ND
12	M	49	Yes	42	Needle Accident	2	443	0.6	4.8	4.0	CCR5	B	35	51
Median	Men	32	Yes	36		0 (17%)	376	0.3	5.4	3.9	CCR5	B		
[IQR 25–75]	(83%)	[24–49]	(92%)	[30–41]		2 (8%)	[341–516]	[0.2–0.9]	[5.0–5.8]	[3.5–4.3]	(100%)	(75%)		
	Women					3 (67%)						Non-B		
	(17%)					4 (8%)						(25%)		

Abbreviations: CD4, CD4+ T lymphocyte; CD8, CD8+ T lymphocyte; DNA, Deoxyribonucleic acid; HIV, Human immunodeficiency virus; HLA, Human leukocyte antigen; HTS, Heterosexual transmission; IQR, Interquartile range; Log, decimal Logarithm; M, Man; MSM, Men who have sex with men transmission; MSM/HTS, Bisexual transmission; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells; RNA, Ribonucleic acid; W, Woman.
doi:10.1371/journal.pone.0064219.t001

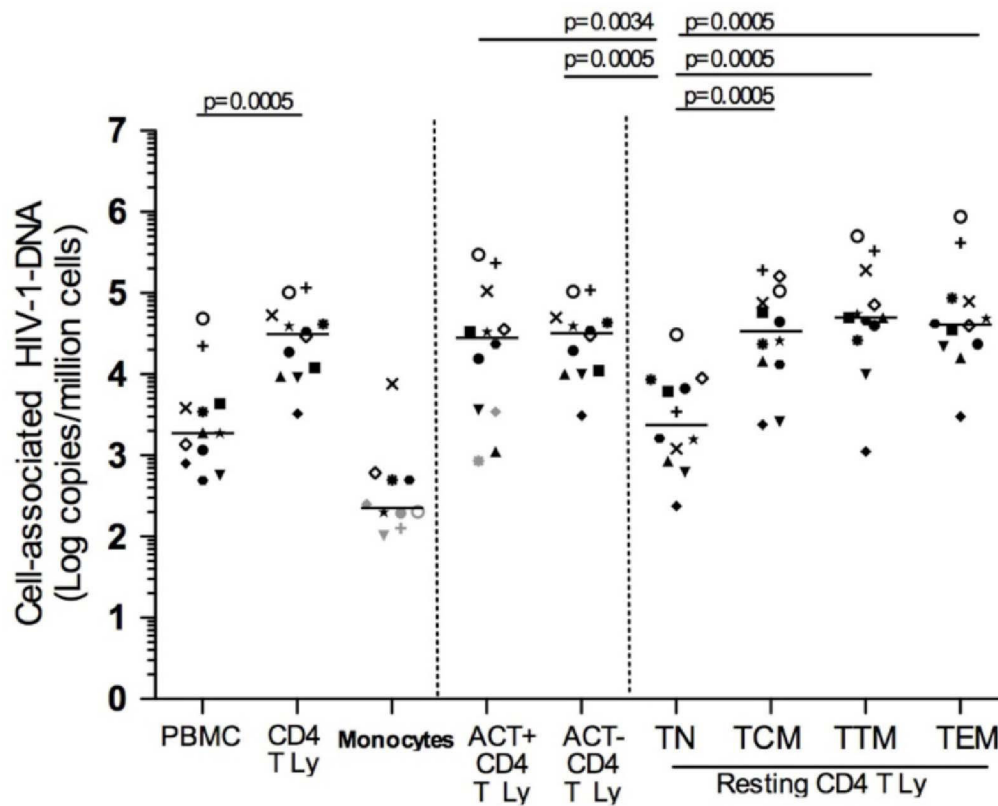


Figure 1. Total HIV-DNA measurement in peripheral blood cell subsets. Total HIV-DNA was quantified in various cell populations from twelve acutely HIV-infected subjects. Results are expressed as the log₁₀ HIV-DNA copies per million cells, and medians are shown. Each symbol represents a subject, and values below the threshold of detection were calculated for each assay according to the number of cells available. Of note, infection levels below the threshold of detection were found in 5/10 monocyte samples and 2/12 activated CD4 T lymphocyte samples (grey symbols). Only significant *p* values are shown. Abbreviations: CD4 T Ly, CD4+ T lymphocyte; ACT+ CD4 T Ly, activated CD4+ T lymphocyte; ACT- CD4 T Ly, resting CD4+ T lymphocyte; TN, naive CD4 T cell subset; TCM, central-memory CD4 T cell subset; TTM, transitional-memory CD4 T cell subset; TEM, effector-memory CD4 T cell subset.

doi:10.1371/journal.pone.0064219.g001

In Acute PHI, a Single Viral Cluster Circulated throughout the Blood CD4 Subsets and the Rectal Compartment

Viral diversity was explored by sequencing HIV-DNA and HIV-RNA in the *ENV C2V5* region of the gp120 gene in eight of the twelve study participants (according to the number of cells available) (Figure 2). Viral clones were analyzed in plasma HIV-RNA and in HIV-DNA from total PBMCs, purified total, activated and resting CD4 T-cell subsets for eight subjects, and finally in either total or CD4+-purified cells from rectal biopsies, available for only two subjects. Cloning using the limiting dilution approach was not possible in some subsets because of insufficient cell numbers available. HIV-1 tropism was CCR5-restricted for the whole 494 isolated clones. The viral quasi-species of each study participant were distributed on different branches, with bootstrap values at 100%. The trees topography showed that the quasi-species identified in plasma, in total and purified peripheral CD4 T-cell subsets and in total and CD4+-purified rectal cells were very homogeneous for each subject; they reflected very minimal viral diversity within the blood and the rectal compartments of these subjects with acute PHI. In seven of these eight subjects (88%), each subject's isolated clones all belonged to a single cluster (which was different for each study participant) (subjects 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7).

Slight diversity was observed in only one subject (subject 8), who had 3 genetic mutations differentiating a cluster exclusively found

in plasma (red symbols) from another cluster found in total activated CD4 T cells, resting TCM and TTM CD4 T-cell subsets, and also in plasma (green and red symbols). The first was the silent C331C mutation, and the other two were encoding mutations. The viral cluster localized only in plasma contained the R335G and N355K mutations, while the other cluster, isolated from cells and plasma, contained the R335R and N355E mutations.

Major Contribution of the TTM Subset to the Pool of Infected Resting CD4 T Cells in Acute PHI

To evaluate the relative contribution of each subset to the whole pool of infected resting CD4 T cells, we analyzed the repartition of each subset among resting CD4 T cells. First, there were surprisingly few activated CD4 T cells; the median frequency of these CD25+CD69+HLA-DR+ cells was 6%, while the frequency of CD8-cell activation was much higher, at a median of 55% (Figure S2A). Therefore, activated CD4+ T cells accounted for only 9% of the peripheral blood total HIV-DNA [4–13]. This contribution was nonetheless significantly higher than the 2% contribution of monocytes [0.4–2.7] (*p* = 0.0128) (Figure 3A). Resting CD4 T cells accounted for the vast majority of total CD4 T cells, and contributed the most to the total HIV-DNA in PBMCs with a median of 89% [86–94], significantly higher than

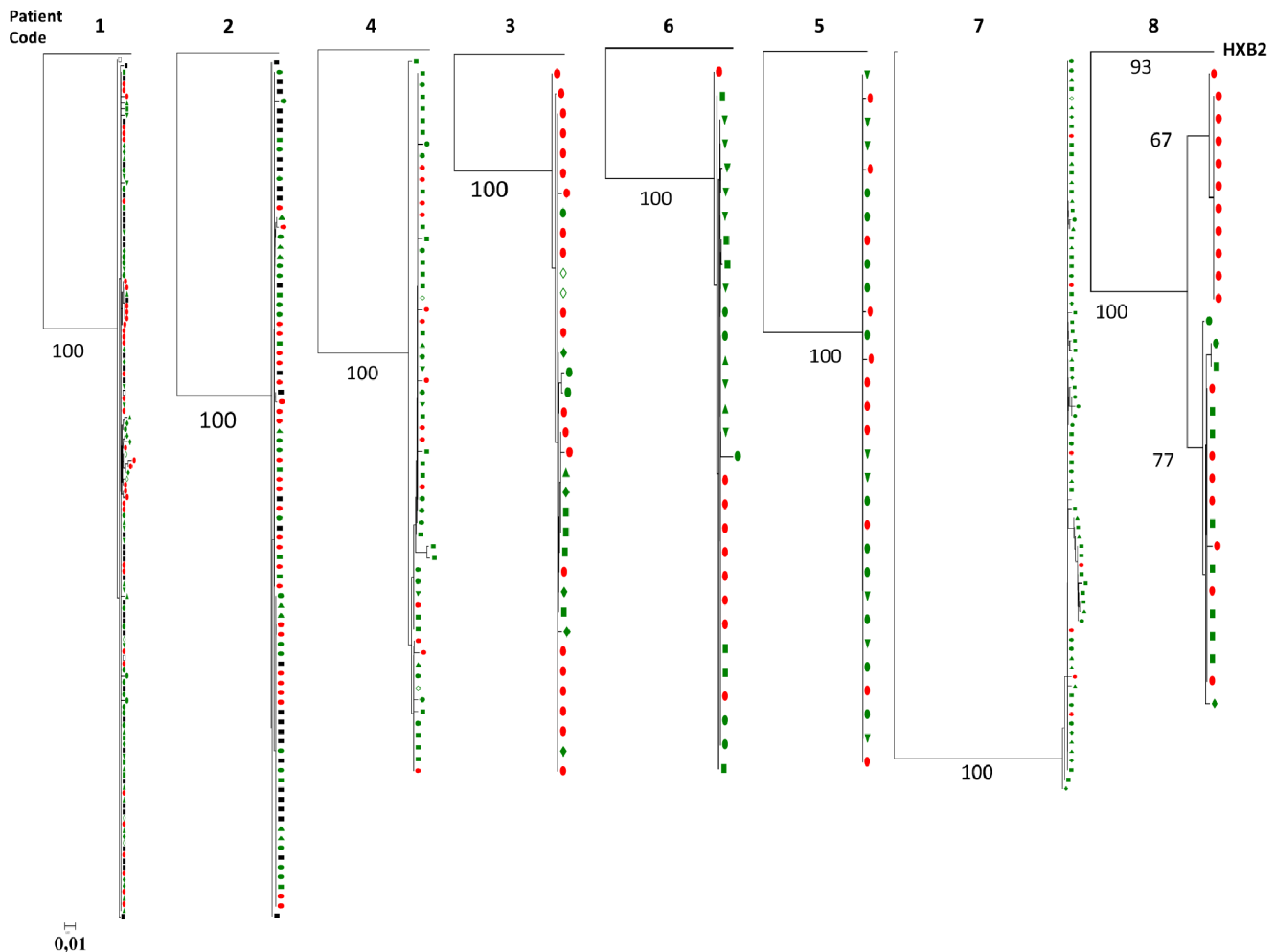


Figure 2. HIV-1 diversity in blood and rectal cell subsets. Each HIV-1 clone was compared to the sequence of reference FR-HXB2, figured on top of each maximum-likelihood tree as root. The numbers near the nodes indicate the percentage of bootstrap replicates (1,000). The *ENV* gene was cloned from plasma HIV-RNA (red circle), and from HIV-DNA in resting CD4 cells (green down-triangle), activated CD4 cells (open diamond), resting TN cells (green diamond), resting TCM cells (green square), resting TTM cells (green circle), resting TEM cells (green up-triangle), total rectal cells (black square) and isolated-CD4+ rectal cells (open square). Subject identification codes are indicated on top of each tree. All clusters identified with the maximum-likelihood approach were confirmed with a neighbor-joining analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0064219.g002

both the contributions of activated CD4 T cells and monocytes ($p = 0.0010$).

Comparing the resting CD4 subsets frequency of the twelve acutely-infected individuals to the one of ten uninfected individuals showed a strongly skewed CD4 subsets repartition among the HIV-infected individuals (Figure 3B). The frequency of differentiated short-lived subsets was at least twice as high among study participants (median 30% TTM cells [22–39] and 7.4% TEM cells [5–11]) than in uninfected individuals (median 14% TTM cells [10–19] and 1.9% TEM cells [1.7–3.2], $p = 0.0010$). This relative increase was balanced by a significant decrease ($p < 0.0014$) in patients' long-lived subsets with a median frequency of 26% TN cells [14–33] and 16% TCM cells [13–20], compared to uninfected individuals (median 48% TN [45–58] and 26% TCM [25–32]).

Each subset contribution to the pool of infected resting CD4 T cells was then calculated by taking into account the infection level and frequency in blood of each (Figure 3C). Accordingly, the TTM subset accounted for more than half of the total infected resting CD4 T cell pool, with a median of 58% [39–74]

($p < 0.0093$), a proportion 3.4 times higher than that of TCM (17% [9–40]) and 6 times higher than that of TEM (9.7% [6–19]). Finally, although TN represented 26% of the resting CD4 cells and were massively infected, they contributed to only 2% [1–5] of the pool of infected resting CD4 T cells. In contrast, the other 74% resting memory CD4 T cells accounted for almost the entire pool of peripheral infected resting cells, with a median of 98% [95–99] ($p = 0.0005$), thus representing a major contributor to the HIV reservoir.

Resting CD4 Subsets Produce HIV Upon *in vitro* Activation, thereby Contributing to the HIV Reservoir

The capacity to induce HIV replication from resting CD4 T-cell subsets was evaluated by culturing sorted-TN, TCM, TTM and TEM from available samples for nine subjects, after anti-CD3/anti-CD28 co-stimulation and IL-2 with or without IL-7, or stimulation by IL-7 alone (Figure 4). In order to compare HIV production between subsets, we normalized HIV-RNA measurements to the infection level of each subset.

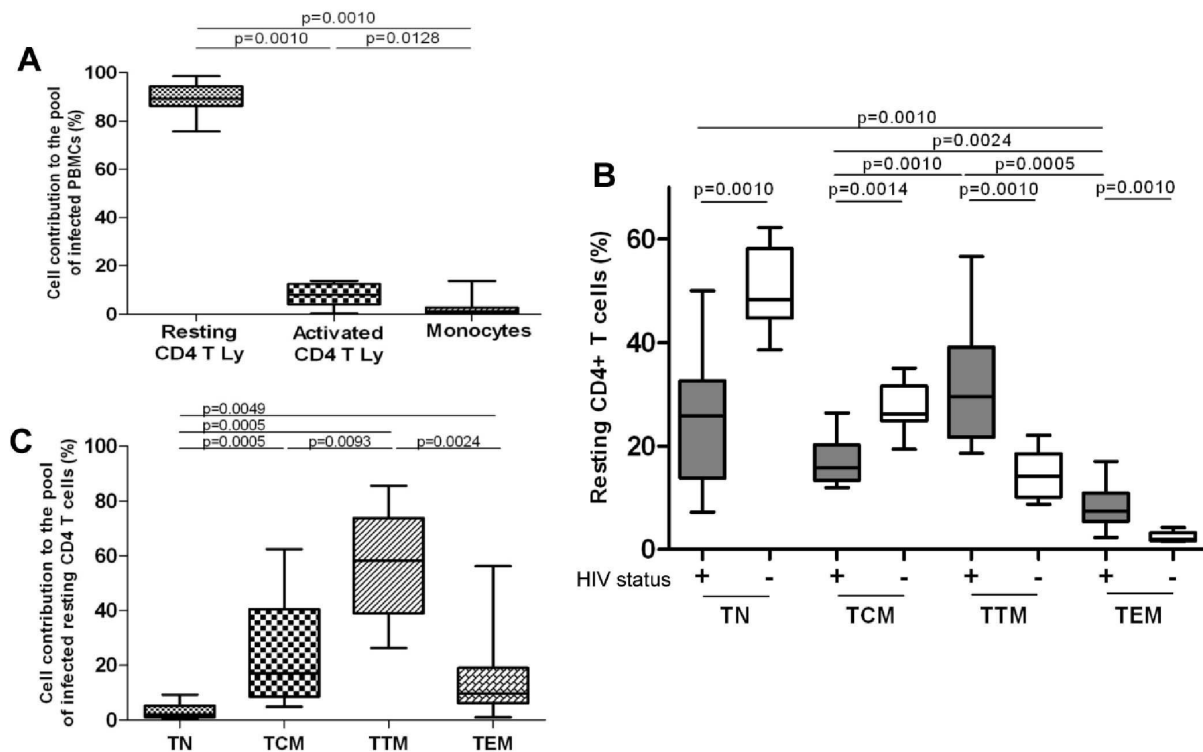


Figure 3. CD4 T cell subsets repartition and contribution to the pool of infected cells. **A:** Monocytes, activated and resting CD4 T-cell (CD4 T Ly) contributions to the pool of infected PBMCs were calculated with the infection level and frequency of each subset. Only significant *p* values are shown. **B:** The repartition of resting CD4 T-cell subsets was assessed in twelve acutely HIV-infected individuals (grey) and in ten uninfected individuals (white). The analyzed resting CD4+ subsets are: naive (TN, CD45RA+CCR7+CD27+), central-memory (TCM, CD45RA+CCR7+CD27+), transitional-memory (TTM, CD45RA+CCR7+CD27+) and effector-memory cells (TEM, CD45RA+CCR7+CD27-). Results are expressed as the percentage of resting CD4 T cells. **C:** Resting CD4 T-cell subset contributions to the pool of infected resting CD4 T cells were calculated with the infection level and frequency of each subset.

doi:10.1371/journal.pone.0064219.g003

A strong TCR-stimulating signal (anti-CD3/anti-CD28 co-stimulation and IL-2) given at D0 was able, as expected, to induce viral replication in all resting naive and memory CD4 subsets in a time-dependent manner, to as much as 8 log HIV-RNA copies/HIV-DNA copies (Figures 4A). When normalized to the HIV-DNA content, the level of viral production was 3 log higher from D8 to D13 in TCM and TTM compared to other subsets. This HIV production paralleled cell proliferation in all four subsets, with a peak of EdU+ cells at D3 (50%) and a more gradual increase in total cell count (Figure S3), contrasting with cell mortality increase and intracellular Bcl-2 expression decrease over time (Figure S4).

We then explored the capacity of IL-7 to reactivate HIV production from resting CD4 T-cell subsets. Results are expressed as the ratio between the normalized HIV production in the IL-7-containing stimulation and in the IL-7-free stimulation. Low concentrations of IL-7 alone (1 ng/ml) induced viral production 1 to 2 log higher than the spontaneous level in all subsets (Figure 4B). Also, HIV production was multiplied by 100 in the TN subset, and by 10 in the TCM, TTM and TEM subsets, while neither cell proliferation nor cell survival were associated with viral production. This finding demonstrated that IL-7 induced viral replication independently of cell proliferation and survival (Figure S3 and S4). When added to the TCR-stimulating signal, IL-7 enhanced virus production preferentially in the TN subset, with a higher viral production at D13 than the one induced by the TCR-stimulating signal alone (Figure 4C). Consistent with the ability of IL-7 to trigger HIV-1 production, resting CD4 T cells from acutely-

infected individuals displayed the IL-7 α chain receptor (CD127) with a gradient from TN to memory CD4+ cells (Figure S5A), and were able to transduce IL-7 signaling by triggering STAT5 phosphorylation at these low concentrations (Figure S5B).

Altogether, viral production took place in all resting naive and memory CD4 T-cell subsets in a time-dependent manner, regardless of the stimulus, but with a flexible pattern that depended on both the stimulus and the subset differentiation stage.

Discussion

A better understanding of the initial sequence of events resulting in the early spread of HIV-1 and the constitution of the HIV reservoir in primary HIV-1 infection is essential for defining eradication strategies leading to an HIV cure. In our study, we demonstrated that only a month after infection, a single HIV-1 cluster is massively distributed within resting naive and various memory CD4 cell subsets, and that the relative contribution of each subset to the whole infected CD4 cell compartment reflects the skewed immune homeostasis at this early stage of PHI. This clonal HIV was inducible in all resting CD4 T-cell subsets, confirming the actual contribution of those cells as a HIV reservoir, as previously defined [1]. The flexibility of viral production according to subsets suggests that subsets activation and differentiation, but not viral diversity, determine the relative subsets contribution to the HIV reservoir.

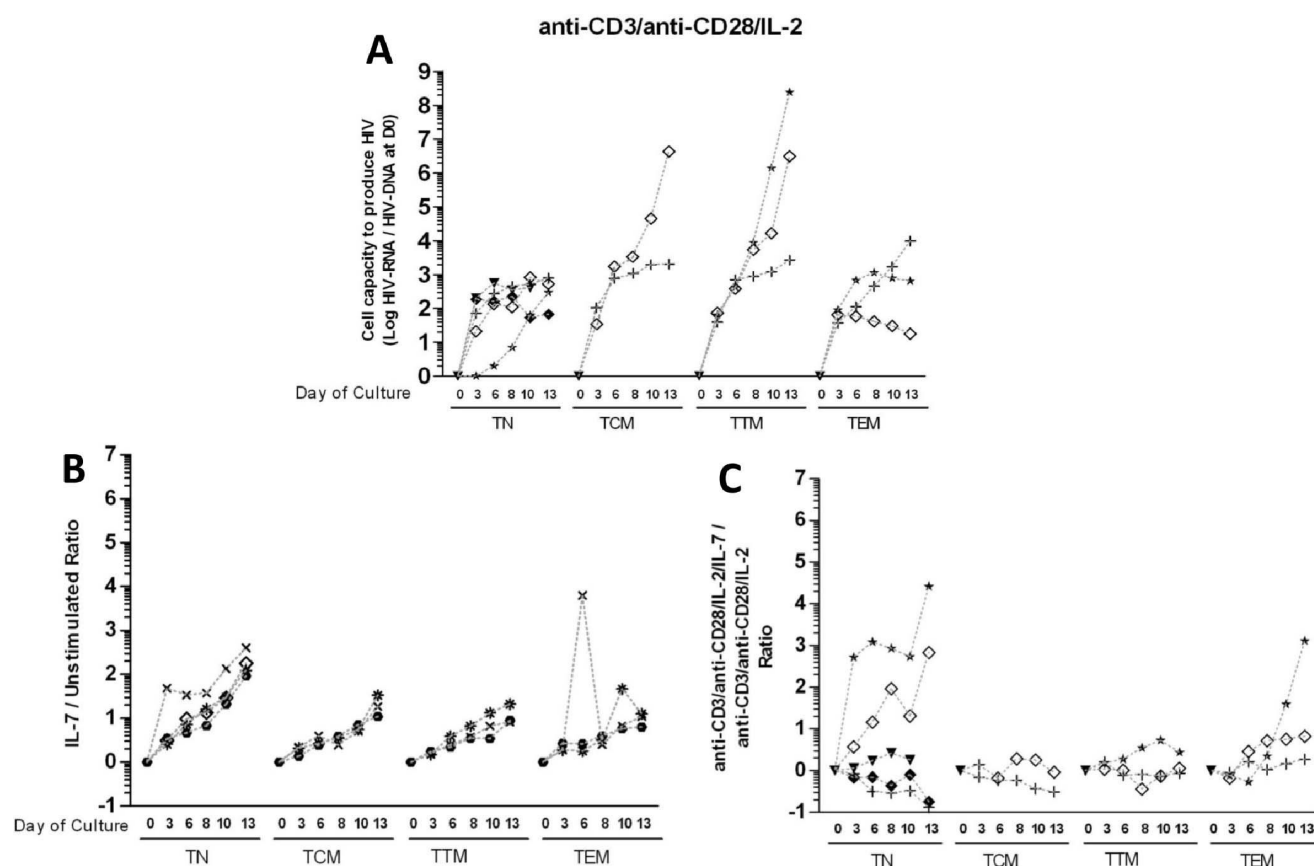


Figure 4. Inducibility of HIV in resting CD4 T cell subsets. **A:** Cell capacity to induce HIV replication from resting CD4 T cells was evaluated in nine subjects by stimulating sorted CD4 T-cell subsets with anti-CD3/anti-CD28 co-stimulation plus IL-2. HIV-RNA was quantified in supernatants of resting TN, TCM, TTM and TEM cells during a 13-day long culture at D3, D6, D8, D10 and D13. Results are expressed as the log10 of the ratio between the number of HIV-RNA copies quantified on a given day of culture and the level of total HIV-DNA in the subset measured at D0 of culture. Each symbol represents a subject. **B and C:** Resting CD4 T cell subsets were stimulated by a CD3/CD28 co-stimulation plus IL-2+/- IL-7, with IL-7 alone or without stimulation. In order to evaluate the effect of IL-7 on HIV production, results are expressed as the log10 of the ratio between the normalized HIV production in the IL-7-containing stimulation and in the IL-7-free stimulation (**B**, IL-7/unstimulated ratio; **C**, CD3/CD28 co-stimulation plus IL-2 plus IL-7/CD3/CD28 co-stimulation plus IL-2 ratio).

doi:10.1371/journal.pone.0064219.g004

To our knowledge, our study is the first to assess the distribution, diversity and dissemination kinetics of HIV-1 among the various resting CD4+ cell subsets so early after infection. Our study provides much earlier information about the spread of HIV than a previous study performed in late PHI (i.e., 6 months after infection), and that did not distinguish between resting and activated CD4 T-cell subsets for HIV-DNA quantification [17]. Our results demonstrate that the spread of the HIV reservoir occurs very rapidly after contamination. To evaluate HIV-1 spread, we chose to quantify total HIV-DNA as it allows measurement of all HIV forms. It is often argued that integrated provirus is the most representative form of the reservoir; however unintegrated forms can also lead to a productive viral cycle [20]. Whether unintegrated HIV-DNA is dominant in PHI remains unknown. Moreover, it was clearly shown that total HIV-DNA is a good predictive factor of disease progression in PHI [21], while it is also well correlated to integrated HIV-DNA [2,13] and to the productive reservoir measured by IUPM in treated individuals [22].

One month after infection, seven of eight subjects for whom samples were available had only a single viral cluster (different for each subject) responsible for the broad viral spread throughout the blood and rectal compartments. Apart from its early kinetics, this

finding is consistent with most studies that showed restricted viral diversity within the first 6 months of PHI [5,23]. The most likely explanation is that the productive infection resulted from a single genetically restricted HIV variant that had not yet diversified, although we cannot rule out the possibility that the number of clones we explored was insufficient to observe viral diversity or that various defective transmitted clones might have been negatively selected [5]. In addition, we cannot exclude the homeostasis of the CD4 compartment could lead to cell proliferation and differentiation of subsets without virus production and diversification. However, this hypothesis seems poorly plausible in early infection, given the huge viral production assessed by plasma HIV loads reaching up to 10^7 HIV-RNA copies/ml. Slightly compartmentalized diversity was observed in one subject, perhaps due to viral production from another source, including an anatomic sanctuary [24,25] or another cell type [26]. Finally, although the very limited sampling of rectal biopsy tissue does not provide a full picture of HIV infection, we detected the same viral cluster in both rectal tissue and blood a month after infection in two of two study participants, whereas reports in late PHI and in chronic stages show different clusters in these compartments [25]. Our findings thus demonstrate for the first time the early and homogeneous viral spread of the founder virus

among all subsets of CD4+ cells, regardless of their lineage, activation or differentiation.

Our results show a massive infection of all resting CD4 T cell subsets by this CCR5-restricted viral cluster, involving predominantly all memory CD4 T cell subsets but also TN cells. Such TN cell infection, although a tenth as frequent as in memory cells, contrasts with their low CCR5 expression and with the usual dogma of a preferential CXCR4-restricted infection thought to affect naive CD4 T cells during acute infection [27]. Nonetheless, the skewed repartition of cell subsets we observed within the resting CD4 compartment resulted in the predominant contribution of the short-lived TTM and TEM subsets, which accounted for two thirds of the whole infected CD4 cell compartment. In chronically infected treated patients, on the other hand, TCM cells were the main contributor to the reservoir while they accounted for less than 20% in our study [28]. Such impact of the skewed repartition of CD4 subsets might be peculiar to early PHI since no abnormal repartition had been reported in late untreated PHI, compared to that of uninfected individuals [17]. Contrasting with this previous study, ours might therefore have been performed before the viral setpoint has been reached. Our results show infection of the monocyte population as well, though at a much lower level than CD4 T cells. Although we cannot exclude some contamination in the sorted monocyte fraction, the high purity of sorted subsets suggests monocytes are actually infected.

These high levels of infected cells within the resting CD4 T cell compartment contrast with the low CD4 activation levels we observed among total CD4 T cells, an observation that might question the dogma linking the expression of activation markers to productive infection. However, these low levels of activated CD4 T cells are similar to levels reported by other studies in late PHI [17], but should not reflect a technical bias since we did find very high levels of activated CD8 T cells. We cannot rule out the possibility that activated cells have either migrated towards tissues or died from viral cytopathogenic effects, cell apoptosis or the onset of immune responses. Interestingly, the observation, though limited, of a depletion in rectal activated TEM cells in our two rectal biopsy specimens, suggests that the highly activated TEM cells might also die rapidly *in vivo* (data not shown). The predominance of the most differentiated memory subsets (TEM and TTM) might also reflect the massive onset of immune defenses at this early stage of HIV infection.

In our study, total HIV-DNA was fully inducible in all resting CD4 T-cell subsets, including in naive cells, making this total HIV-DNA content a likely part of HIV reservoirs. A spontaneous HIV production was even detectable *in vitro* in all memory CD4 T cell subsets over the 13 day-long culture, re-emphasizing the hypothesis this reservoir might not represent a latent reservoir yet at this early stage of infection. By normalizing to the infection level of each subset, we showed this clonal CCR5-restricted virus could be massively produced by TN cells, as well as by all memory subsets, especially when IL-7 was added to the stimulating cocktail. Of note, low doses of IL-7 clearly triggered STAT5 signaling in all subsets, except for the activated-effector cells (ACT+RA+), and induced potent HIV production without promoting cell proliferation, especially in naive CD4 T cells. Our results are in accordance with prior studies showing IL-7-induced HIV replication both *in vitro* in primary and thymic CD4+ T cells [29,30]. This homeostatic cytokine might thus participate in both the TN high infection level and the increased TN turnover.

Finally, most subjects met criteria associated with disease progression, such as symptomatic PHI, a low CD4-cell count, a low CD4/CD8 ratio, and for a third of subjects the HLA B*35 allele, a marker of poor prognosis. Therefore, they might not reflect the vast

majority of acutely-infected individuals, given that PHI might be symptomatic in only 50 to 60% of patients for one [31]. However, our study could not have been conducted without using those criteria to select the twelve acutely-infected study participants who were included very rapidly after infection. These twelve subjects volunteering for this sub-study are, nonetheless, representative of the ninety study participants included in the OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial, which is still ongoing as antiretroviral therapy was initiated immediately after this sub-study.

In conclusion, we demonstrate here that a month after infection, a single CCR5-restricted viral cluster massively and broadly spreads among all resting CD4 T-cell subsets, including naive cells. We report that the long-lived TN and TCM subsets account for a small portion of the infected CD4 cell compartment compared with the short-lived TTM and TEM subsets, and hypothesize that this poor contribution reflects massive early perturbations of immune homeostasis during acute PHI. These results offer new elements advocating for an early antiretroviral therapy and new insights for future strategies to develop both a cure for HIV and vaccines targeting this early stage.

Materials and Methods

Ethics Statement

After obtaining written informed consent, peripheral blood and rectal biopsies were collected from HIV-1 infected volunteers in research centers involved in the OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial (ID RCB: 2009-014742-28). Eligible participants were age 18 or older. The study was reviewed and approved by both the Independent Protection Committee “Sud-Méditerranée 1” and the French Health Products Safety Agency (AFSSAPS). Human experimentation guidelines of the declaration of Helsinki, the French Public Health Code and the Guidelines for Good Clinical Practice from the French Department of Health were followed in the conduct of this research.

Patient Characteristics

Ninety study participants presenting with acute primary HIV-1 infection (PHI) were included in the randomized multicentered OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial, among whom twelve subjects gave their written consent to be enrolled in our Reservoir sub-study. The main objective of the OPTIPRIM study is to evaluate the impact on the HIV reservoirs of a standard two year-long 3-drug and an intensified 5-drug antiretroviral therapy in patients treated in acute and early PHI. Early PHI was defined by a positive ELISA assay, with an incomplete western blot assay performed within 8 days of inclusion (two to five antibodies), a positive plasma viral load, and with the presence of anti-p24 antibodies associated with anti-gp160, anti-gp120 or anti-gp41 antibodies. Enrollment in the OPTIPRIM ANRS-147 trial required meeting those biologic criteria and having either symptomatic PHI or a CD4 cell count below 500/mm³ plasma. Time from infection was estimated by adding 15 days to the time from the first symptoms or 30 days in the case of an incomplete western blot, or by the median date between the last negative and first positive serology. Blood samples were collected at inclusion before treatment initiation.

Acutely HIV-infected individuals' characteristics were compared to the ones of ten uninfected individuals whose blood samples were obtained from the French Blood Agency (EFS) after informed and signed consent.

CD4 T Cell Differentiation Analysis and Sorting

PBMC cryopreserved and stored in liquid nitrogen, with more than 80% viability after thawing, were sorted as live monocytes (CD3–CD4+) or activated and resting CD3+CD4+ T cells on a 5-laser FACS ARIA (Becton Dickinson) on the CyPS platform (UPMC) after staining with the following combination: Live-Dead Fixable Aqua (Life Technologies), CD3-Pacific Blue (UCHT1), CD4-AlexaFluor700 (RPA-T4), CCR7-PE Cyanine7 (3D12), CD27-APC (L128), CD69-FITC (L78), HLA-DR-FITC (L243) and CD127-PE (IL7R-M21) from BD Pharmingen, CD45RA-ECF (2H4) and CD25-FITC (B1.49.9) from Beckman Coulter. Resting CD4 T cells (CD25–CD69–HLA-DR–) were further sorted as: naive (TN, CD45RA+CCR7+CD27+), central-memory (TCM, CD45RA–CCR7+CD27+), transitional-memory (TTM, CD45RA–CCR7–CD27+), and effector-memory cells (TEM, CD45RA–CCR7–CD27–) (Figure S1). Of note, antigens expression on thawed cells was not significantly different than the one on fresh cells, and cell activation was evaluated on fresh cells. The number of cells collected ranged from 0.01 to 1.7 million cells per subset and per subject, and the purity of sorted subsets was over 95%. Flowjo software (Treestar) was used to analyze the data. Sorted cells were resuspended in Buffer RLT Plus (Qiagen) before storage at –80°C for further quantitative HIV-DNA quantification and sequencing.

Ultrasensitive Total HIV-DNA and HIV-RNA Quantification

Total HIV-DNA was quantified by ultrasensitive real-time PCR in PBMC, monocytes, activated or resting CD4 and CD4 T-cell subsets using the GENERIC HIV-DNA assay from Biocentric (Bandol, France), with a threshold of detection of 5 HIV-DNA copies per PCR as previously described [32]. Total DNA was extracted with a QIAamp All prep DNA/RNA microkit (Qiagen), depending on the number of cells available (< and >1 million cells respectively). The entire HIV-DNA extract was tested in two to four replicates. Results were reported as either the actual number of HIV-DNA copies per million cells or as an estimated value calculated as 50% of the detection threshold value when HIV-DNA was not detected. The thresholds varied according to available cell numbers and were calculated for each sample. HIV-RNA was quantified in plasma by real-time RT-PCR with the Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 assay (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's recommendations. HIV-RNA was quantified in culture supernatants by ultrasensitive real-time PCR using the GENERIC HIV assay (Biocentric, Bandol, France). The extracts were tested in two to five replicates.

HIV-DNA Clotyping and Phylogenetic Analysis

HIV envelope genes were cloned in plasma after extraction of RNA and reverse transcription and in cells after extraction of DNA from PBMCs and rectal biopsies. Amplification of the *ENV* C2V5 region of the gp120 gene by nested PCR followed, as previously described [33]. Clonal analysis was performed with a limiting dilution approach. Samples were purified with the QIAquick PCR purification HIV kit (Qiagen), and PCR products were sequenced with the fluorescent dideoxy-terminator method (Big Dye Terminator kit, Perkin Elmer) on an ABI 330 Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystem). Sequences were verified with Sequence Navigator software. All sequences of the *ENV* C2V5 gene region were aligned with Clustal X 2.0.11 software. Pairwise evolutionary distances were estimated with DNAdist, with Kimura's two-parameter method [34], and the phylogenetic trees were built by a neighbor-joining method (DNAdist module – Phylip Package v3.67). The reliability of each tree topology was estimated from 1000 bootstrap replicates.

HIV Reactivation Assay

Variable numbers of sorted peripheral resting CD4+ TN, TCM, TTM and TEM subsets (from 0.05 to 1 million cells) from nine subjects were cultured in 10% FCS-supplemented RPMI 1640 medium for 13 days after stimulation at day 0 with human recombinant IL-7 alone (R&D Systems, 1 ng/ml) or anti-CD3/anti-CD28+IL-2 (Roche, 5 µg/ml) +/– human recombinant IL-7. At days 3, 6, 8 and 10, half of each supernatant was removed to quantify HIV-RNA, and IL-2 and IL-7 were added. HIV-RNA was also quantified at Day 13. Results are expressed as the ratio between the number of HIV-RNA copies in supernatants on each day of culture and the level of total HIV-DNA in the subset measured at Day 0 of culture.

In parallel to HIV-RNA quantification, cell proliferation was evaluated on days 3, 6, 8, 10 and 13 by the Click-iT EdU AlexaFluor647 kit (Life Technologies), according to the manufacturer's recommendations. Cell survival was measured by the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 (Bcl-2/100) by flow cytometry.

Cell Signaling Assay

IL-7R signaling was assessed by intracellular staining of the phosphorylated STAT5 molecule (pSTAT5). PBMCs were stimulated by human recombinant IL-7 (R&D Systems, 1 ng/ml) or left unstimulated for 15 minutes. After fixation with Cytofix 1X, cells were permeabilized with 1 ml ice-cold Perm III buffer (Becton Dickinson) for 30 minutes on ice. Staining was performed with the following combination: CD3-Pacific Blue, CD4-AlexaFluor700, CD69-FITC, HLA-DR-FITC, pSTAT5-A647 (Y694, clone 47) and IgG1k-A647 (BD Pharmingen), CD45RA-ECF and CD25-FITC (Beckman Coulter).

HIV-1 Tropism

The *ENV* C2V5 region (gp120 gene) was amplified from plasma HIV-RNA and HIV-DNA associated with peripheral blood cells. HIV-1 co-receptor usage was predicted by a genotypic method that used the Geno2phenoreceptor rule (available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>), with a 5% false-positive rate.

Statistical Analysis

A two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare cell subsets, and Mann-Whitney test to compare the different groups. A *p* value lower than 0.05 was considered a significant difference. All values given in the text are medians and [IQR 25–75%].

Supporting Information

Figure S1 Cell sorting strategy. Live resting CD3+CD4+ T cell subsets (CD25–, CD69– and HLA-DR–) were sorted by flow cytometry according to their expression of CD45RA, CCR7 and CD27, as naive (TN, CD45RA+CCR7+CD27+), central-memory (TCM, CD45RA–CCR7+CD27+), transitional-memory (TTM, CD45RA–CCR7–CD27+), and effector-memory cells (TEM, CD45RA–CCR7–CD27–). (TIF)

Figure S2 Analysis of the immune cell activation. Immune activation was evaluated in total CD4 and CD8 T cells (A) and in CD4+ TN, TCM, TTM and TEM cell subsets (B) by measuring the expression of CD25, CD69 and HLA-DR. Results are expressed as the percentage of cells expressing at least one of the 3 molecules within each cell population. The boxplot presents

the median, IQR [25–75%] and minimum and maximum values. Only significant *p* values are shown. (TIF)

Figure S3 Cell proliferation associated with HIV inducibility. Cell proliferation was measured together with HIV inducibility for six subjects for whom samples were available, by culturing sorted-resting TN, TCM, TTM and TEM CD4+ T cell subsets for 13 days with a CD3/CD28 co-stimulation plus IL-2 (**B** and **F**) plus IL-7 (**C** and **G**), with IL-7 alone (**A** and **E**), or without stimulation (**D**). Cell proliferation was assessed by EdU incorporation, and results are expressed as the percentage of EdU+ cells (**A**, **B** and **C**). The fold-increase in the number of cells from baseline was also calculated for each stimulating condition (**D**, **E**, **F** and **G**). Each symbol represents a subject. (TIF)

Figure S4 Cell survival associated with HIV inducibility. Cell survival was measured together with HIV inducibility for six subjects for whom samples were available, by culturing sorted-resting TN, TCM, TTM and TEM CD4 T cell subsets for 13 days with a CD3/CD28 co-stimulation plus IL-2 (**B** and **F**) plus IL-7 (**C** and **G**), with IL-7 alone (**A** and **E**), or without stimulation (**D**). Cell survival was assessed by the expression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2, and results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of Bcl-2 expression (**A**, **B** and **C**), whereas cell mortality was assessed by Trypan Blue exclusion and results are expressed as the percentage of dead cells (**D**, **E**, **F** and **G**). Each symbol represents a subject. (TIF)

Figure S5 Ability of CD4 T-cell subsets from acutely HIV-infected individuals to sense and transduce IL-7 signaling. **A:** Expression of IL-7R α (CD127) was measured in resting CD4+ TN, TCM, TTM and TEM subsets. Results are expressed as the percentage of cells expressing the CD127 molecule within each cell population. Each symbol represents a subject. **B:** Cell capacity to trigger IL-7 signaling was assessed by the detection of the phosphorylated STAT5 molecule (pSTAT5) after *in vitro* stimulation by IL-7 in three acutely HIV-infected individuals (grey) and in seven uninfected individuals (open circle).

References

- Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53: 557–593.
- Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, et al. (2013) Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathogens* 9(2): e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174.
- Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, et al. (2006) CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin Infect Dis* 42: 709–715.
- Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 364: 1943–1954.
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, et al. (2008) Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7552–7557.
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10: 11–23.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093–1097.
- Kinloch-de Loes S, de Saussure P, Saurat JH, Stalder H, Hirschel B, et al. (1993) Symptomatic primary infection due to human immunodeficiency virus type 1: review of 31 cases. *Clin Infect Dis* 17: 59–65.
- Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, et al. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 24: 819–831.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, et al. (1997) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387: 183–188.
- Chun TW, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, et al. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS*.
- Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard K, Zhang ZQ, et al. (2001) Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 183: 555–562.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, et al. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869–8873.
- Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, et al. (2003) Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17: 1871–1879.
- Ananworanich J, Schuetz A, Vandergaeten C, Sereti I, de Souza M, et al. Impact of Multi-Targeted Antiretroviral Treatment on Gut T Cell Depletion and HIV Reservoir Seeding during Acute HIV Infection. *PLoS One* 7: e33948.
- Centivire M, Legrand N, Steingrover R, van der Sluis R, Grijzen ML, et al. Altered dynamics and differential infection profiles of lymphoid and myeloid cell subsets during acute and chronic HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*.
- Ganesan A, Chattopadhyay PK, Brodie TM, Qin J, Gu W, et al. Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. *J Infect Dis* 201: 272–284.
- Dalmasso C, Carpentier W, Meyer L, Rouzioux C, Goujard C, et al. (2008) Distinct genetic loci control plasma HIV-RNA and cellular HIV-DNA levels in HIV-1 infection: the ANRS Genome Wide Association 01 study. *PLoS One* 3: e3907.

Cell subsets were selected by the differential expression of CD45RA (RA+/-) and the expression of at least one of the three activation molecules CD25, CD69 and HLA-DR (ACT+/-). Results are expressed as the difference between the mean fluorescence intensity (MFI) of the pSTAT5 signal in response to IL-7 and without stimulation.

(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank the ANRS for supporting the study, and also acknowledge the scientific committee of the OPTIPRIM ANRS 147 study for its members' intellectual and conceptual contributions. We particularly want to thank Catherine Blanc and Bénédicte Hoareau for their exceptional cell sorting capacities at the CyPS Flow Cytometry platform at Pitié-Salpêtrière hospital.

The members of the OPTIPRIM ANRS 147 study are Charline Bacchus, Brigitte Autran, Catherine Blanc, Christine Katlama, Marc-Antoine Valentin, Assia Samri, Sophie Seang, Lunita Schneider (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France); Antoine Cheret, Christine Rouzioux, Véronique Avettand-Fenoël, Adeline Mélard (Necker Enfants-Malades Hospital, Paris, France); Georges Nembot, Laurence Meyer, Cécile Goujard, Yann Quertainmont, Imane Amri, Erwan Fourn (Le Kremlin-Bicêtre Hospital, Paris, France); Caroline Lascoux-Combe, Jean-Michel Molina (Saint-Louis Hospital, Paris, France); Laurence Slama, Thomas Lyavanc (Tenon Hospital, Paris, France); Thierry Allegre (Aix-en-Provence Hospital, Aix-en-Provence, France); Clotilde Allavena, Bénédicte Bonnet, François Raffi, Sabelline Bouchez (Hôtel-Dieu Hospital, Nantes, France); Yazdan Yazdanpanah, Thomas Huleux, Séverine Bonne (Gustave Dron Hospital, Tourcoing, France); Claudine Duviol, Paul-Henry Consigny, Michka Shoaï, Caroline Charlier (Necker-Pasteur Infectious Diseases Center, Paris, France); Bao Chau Phung Seksik, Frédérique Guiryo (Bichat Hospital, Paris, France); Anne Leplatois, Alissa Naqvi (L'Archet Hospital, Nice, France).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C. Bacchus AC BA CR VAF GN CLC LS TA CA YY CD CK CG BCPS AL JMM LM. Performed the experiments: C. Bacchus AC AM C. Blanc. Analyzed the data: C. Bacchus AC VAF BA CR GN LM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CLC LS TA CA YY CD CK CG BCPS AL JMM. Wrote the paper: C. Bacchus AC BA VAF CR.

19. Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brannstrom J, Shao W, et al. Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11199–11204.
20. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA (1990) HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *The EMBO journal* 9: 1551–1560.
21. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, et al. (2006) CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42: 709–715.
22. Siliciano RF (July 20–21, 2012) HIV Eradication: Understanding the magnitude of the problem. Presented at the International AIDS Society's Pre-Conference Symposium "Towards an HIV Cure", Washington, DC.
23. Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM The detection of acute HIV infection. *J Infect Dis* 202 Suppl 2: S270–277.
24. Chomont N, Hocini H, Gresenguet G, Brochier C, Bouhlal H, et al. (2007) Early archives of genetically-restricted proviral DNA in the female genital tract after heterosexual transmission of HIV-1. *AIDS* 21: 153–162.
25. Avettand-Fenoel V, Hocqueloux L, Muller-Trutwin M, Prazuck T, Melard A, et al. Greater diversity of HIV DNA variants in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *J Med Virol* 83: 1499–1507.
26. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7: 29.
27. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, et al. (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1269–1274.
28. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, et al. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*.
29. Managlia EZ, Landay A, Al-Harthi L (2006) Interleukin-7 induces HIV replication in primary naive T cells through a nuclear factor of activated T cell (NFAT)-dependent pathway. *Virology* 350: 443–452.
30. Pedroza-Martins L, Boscardin WJ, Anisman-Posner DJ, Schols D, Bryson YJ, et al. (2002) Impact of cytokines on replication in the thymus of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from infants. *J Virol* 76: 6929–6943.
31. Pilcher CD, Eron JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS (2004) Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest* 113: 937–945.
32. Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, et al. (2009) LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 81: 217–223.
33. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, et al. (1993) Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257–1261.
34. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111–120.

Article II

CD8 T-cells from most HIV-infected patients lack ex vivo HIV-suppressive capacity during acute and early infection.

Camille Lecuroux #; Isabelle Girault #; **Antoine Chéret**; Pierre Versmisse; Georges Nembot; Laurence Meyer; Christine Rouzioux; Gianfranco Pancino; Alain Venet and Asier Saez-Cirion; **ANRS 147 OPTIPRIM Clinical Trial**

[#]Ces auteurs ont contribué également à la rédaction du manuscrit

Article Publié dans le journal *PLoS One*. March 2013; 8(3): e59767

Objectifs

La primo-infection est caractérisée par une amplification virale majeure et la charge virale ARN-VIH croît exponentiellement avant de s'amender progressivement trois semaines après l'infection au moment de l'émergence de la réponse spécifique T CD8 anti- VIH [73]. La déplétion en lymphocytes T CD8 chez les macaques en primo-infection SIV abolit leur capacité à contrôler la réplication virale [164]. Cela suggère que cette réponse est un facteur déterminant en primo-infection sur le contrôle virologique initiale. Certains des patients HIV qui contrôlent spontanément l'infection avec une charge virale plasmatique indétectable (HIC), présentent une activité T CD8 spécifique contre le VIH liée à des réponses spécifiques anti GAG [490]. Cette activité est déterminante pour le contrôle virologique spontané de l'infection par ces patients. Cependant, il est encore difficile de savoir si ces capacités sont présentes dès la primo-infection. Pour répondre à cette question, nous avons étudié avec l'équipe du Docteur Asier-Saëz-Cirion de l'Unité de Régulation des Infections Rétrovirales de l'Institut Pasteur de Paris, chez 50 patients de l'essai **OPTIPRIM** à l'inclusion, avant la mise sous traitement, la fréquence de cellules T spécifiques du VIH et leur potentiel à produire plusieurs cytokines ainsi que la capacité des cellules T CD8 à contrôler l'infection des lymphocytes T CD4 *ex vivo*.

Principaux résultats

Les réponses spécifiques anti-VIH T CD4 et T CD8 sont présentes chez la majorité des patients. Elles sont associées à une capacité de production d'IL-2 sans différence selon le stade aiguë ou récent de la primo-infection. Les cellules présentant une réponse spécifique sont capables de produire au mieux deux cytokines, le plus fréquemment MIP-1 β et IFN γ et/ou IL-2. Ainsi, la plupart des patients présentant une primo-infection, possèdent des réponses spécifiques T CD4 et T CD8 anti-VIH multifonctionnelles persistantes. Ces réponses sont comparables à celles observées chez les patients HIC. Plus de 48 patients n'ont pas de fortes capacités suppressives du VIH *ex-vivo* par rapport à celles des *Post Treatment Controllers*. Ces capacités ne sont pas corrélées au niveau de charge virale plasmatique et non liées au caractère aiguë ou récent de la primo-infection. Cependant deux patients présentent des capacités suppressives fortes, alors qu'ils n'ont pas de profil immuno-virologique différent des autres patients et ne présentent pas l'haplotype HLA B*27 ou B*57.

Discussion

La réponse T CD8 spécifique du VIH qui a pour objectif d'éliminer les lymphocytes T CD4 infectés est intense chez les patients HIC et coïncide avec la propriété de ces cellules de sécréter plusieurs cytokines, en particulier IL-2, lesquelles sont perdues en phase chronique de l'infection par épuisement de la réponse. Malgré une fréquence élevée de cellules T CD8 spécifiques du VIH polyfonctionnelles et une forte réponse T CD4 auxiliaire, les cellules T CD8 de ces patients en primo-infection ne présentaient pas une forte capacité à supprimer la réplication virale. Ces résultats suggèrent que la majorité des patients en primo-infection n'ont pas encore de capacité à développer des réponses T CD8 à même de supprimer la réplication virale comme chez les HIC. Ces capacités des cellules des HIC s'établit peut être plus précocement et pourrait être due à des propriétés intrinsèques à explorer.

CD8 T-Cells from Most HIV-Infected Patients Lack Ex Vivo HIV-Suppressive Capacity during Acute and Early Infection

Camille Lécroux^{1,9}, Isabelle Girault^{1,9}, Antoine Chéret^{2,3}, Pierre Versmisse⁴, Georges Nembot^{5,6}, Laurence Meyer^{5,6}, Christine Rouzioux^{3,7}, Gianfranco Pancino⁴, Alain Venet¹, Asier Sáez-Cirión^{4*}, ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial[†]

1 INSERM, U1012, Le Kremlin Bicêtre, France, **2** Hôpital Gustave Dron, Service de Maladies Infectieuses et du voyageur, Tourcoing, France, **3** EA 3620, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **4** Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris, France, **5** INSERM U1018, Université Paris-Sud 11, Le Kremlin Bicêtre, France, **6** AP-HP, Hôpital de Bicêtre, Département d'épidémiologie, Le Kremlin Bicêtre, France, **7** AP-HP, CHU Necker-Enfants Malades, Laboratoire de Virologie, Paris, France

Abstract

The strong CD8+ T-cell-mediated HIV-1-suppressive capacity found in a minority of HIV-infected patients in chronic infection is associated with spontaneous control of viremia. However, it is still unclear whether such capacities were also present earlier in the CD8+ T cells from non controller patients and then lost as a consequence of uncontrolled viral replication. We studied 50 patients with primary HIV-1-infection to determine whether strong CD8+ T-cell-mediated HIV suppression is more often observed at that time. Despite high frequencies of polyfunctional HIV-specific CD8+ T-cells and a strong CD4+ T-helper response, CD8+ T-cells from 48 patients lacked strong HIV-suppressive capacities ex vivo. This indicates that the superior HIV-suppressive capacity of CD8+ T-cells from HIV controllers is not a general characteristic of the HIV-specific CD8+ T cell response in primary HIV infection.

Citation: Lécroux C, Girault I, Chéret A, Versmisse P, Nembot G, et al. (2013) CD8 T-Cells from Most HIV-Infected Patients Lack Ex Vivo HIV-Suppressive Capacity during Acute and Early Infection. PLoS ONE 8(3): e59767. doi:10.1371/journal.pone.0059767

Editor: Mathias Lichterfeld, Massachusetts General Hospital, United States of America

Received: November 20, 2012; **Accepted:** February 18, 2013; **Published:** March 29, 2013

Copyright: © 2013 Lécroux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The ANRS 147 OPTIPRIM trial was funded by ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis) and conducted with the support of MSD, Janssen, ViiV Healthcare and Gilead. CL received a postdoctoral fellowship from ANRS. GP is an employee of INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The OPTIPRIM clinical trial was funded by the ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis). However, ANRS received financial support from MSD, Janssen, ViiV Healthcare and Gilead to complement funding concerning this trial. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: asier.saez-cirion@pasteur.fr

† These authors contributed equally to this work.

† Membership of the ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial is provided in Text S1.

Introduction

During the acute phase of HIV-1 infection the virus spreads rapidly through the body and plasma viremia rises exponentially to high levels. Viremia starts to decline gradually three weeks after infection, reaching a stable level a few months later. This “steady state” viremia varies from one individual to another and is predictive of the rate of disease progression. The fall in plasma HIV viremia during the acute infection coincides with the emergence of HIV-specific CD8+ T-cells [1], which exert selection pressure on the virus, forcing it to evolve to elude recognition [2]. In vivo depletion of CD8+ cells in macaques during primary SIV infection abrogates their ability to control primary viremia [3]. These findings suggest that the CD8+ T response is involved in the initial control of viral replication during primary HIV-1 infection (PHI).

HIV-specific immune responses deteriorate as the infection becomes chronic. In particular, HIV-specific CD4+ helper T-cells become dysfunctional [4] and HIV-specific CD8+ T-cells also gradually lose several functions (including their proliferative

capacity, cytotoxic potential, and capacity to produce IL-2 and other cytokines [5]), and become senescent [6]. In many rare “HIV controllers” (HIC), in whom viremia remains undetectable without antiretroviral therapy, highly functional HIV-specific CD8+ T-cells are maintained. These cells are able to produce several cytokines and to proliferate upon antigen stimulation [7,8], even more than ten years after initial infection. CD8+ T-cells from these HIC have an impressive capacity to suppress HIV infection of autologous CD4+ T-cells [9]. This capacity is related to a high frequency of HIV-specific CD8+ T-cells, including those targeting epitopes in Gag [10], and also to their high lytic granule content [11,12]. HIC are a heterogeneous population and some of them have very weak HIV-specific T cell responses [13,14,15], pointing to the existence of additional mechanisms contributing to control infection. Nevertheless, it is believed that this efficient CD8+ T-cell response plays an important role in the spontaneous virus control in many HIC.

It is unclear whether the superiority of HIC CD8+ T-cells to suppress the virus is due to intrinsic characteristics or simply reflects the loss of functional capacity due to persistent viral

replication in non-controllers. To address this question, we studied 50 individuals recently infected with HIV-1, focusing on the frequency of HIV-specific T-cells, their potential to produce several cytokines, and the capacity of CD8+ T-cells to control infection of CD4+ T-cells *ex vivo*.

Materials and Methods

Patients

Fifty participants in the ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial were included in this study (Table 1). OPTIPRIM is a multicentre, phase 3 randomized trial designed to examine the impact, after 24 months, of maximized versus conventional combination antiretroviral therapy (cART) on HIV reservoirs in patients with acute or early primary HIV-1 infection (ClinicalTrials.gov ID: NCT01033760). The 50 study participants were recruited between 2010 and 2011, within ten weeks of diagnosis of symptomatic PHI. Acute infection was defined by a negative or weakly positive HIV-1 Elisa plus a negative or incomplete (1 antibody) HIV-1 Western blot, and HIV-1 RNA and/or p24 antigen positivity. Early infection was defined by a positive HIV-1 Elisa plus an incomplete Western blot (≥ 2 and < 5 antibodies, with the presence of anti-p24 and anti-gp160, -gp120 or -gp41 reactivity) and HIV-1 RNA positivity. The date of infection was estimated as the day of symptom onset minus 15 days, and the interval between infection and inclusion in the study was 35 days [31–43] (median and interquartile range (IQR)). Most of the patients were men ($n = 47$). Age at inclusion was 38 years [29–47]. CD4+ T-cell counts and plasma viral loads at inclusion were 466 [362–652] cells/ μ l and 5.42 [4.99–5.88] log HIV-1 RNA copies/ml. An additional viral load determination, obtained a median of 7 [6–10] days before inclusion in the study, was available for 49 patients with PHI. These viral loads were, in general, higher (5.87 [5.4–7.00] log HIV-1 RNA copies/ml, $P < 0.001$) than at inclusion in the study. Viral load in these patients declined by at least 0.3 log in 27 patients (median -0.94 log HIV-1 RNA copies/ml [0.54–1.19]) during this short period (Figure 1). This showed that, at the time of the study, these patients were in the descending phase of viremia

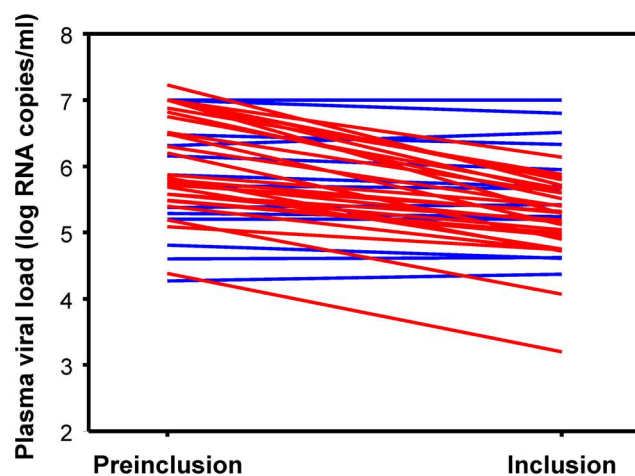


Figure 1. Time course of plasma viral load in PHI patients between the pre-inclusion visit (~d-7) and inclusion of the study (d0). Values for patients who experienced a decline of at least 0.3 log in their viral load (arbitrary threshold) during this period are shown in red, and those from patients whose viral load remained stable are in blue.

doi:10.1371/journal.pone.0059767.g001

that follows peak viral load during PHI. All samples were obtained before the patients initiated treatment.

We compared CD4 and CD8 T-cell responses from patients with PHI to those of 46 HIC from the ANRS CO18 HIV controller cohort (Table 1). HIC were defined as patients who had been infected for more than 5 years and whose last five consecutive plasma viral loads were below 400 HIV-1 RNA copies/ml of plasma. Respectively 16 and 4 HIC carried one protective allele (HLA-B*57 or B*27), and three HIC carried both alleles.

Ethics Statement

All the subjects gave their written informed consent to participate in the study. This study is developed in the context of the ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial (ClinicalTrials.gov ID: NCT01033760) and is sponsored by the French National Agency for research on AIDS and viral hepatitis (ANRS) and was approved by the Sud Méditerranée I ethics review committee and the French Health Products Safety Agency (AFSSAPS).

Cell Sampling and HLA Typing

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from EDTA-anticoagulated blood by Ficoll density gradient centrifugation, and were used fresh (phenotypes, HIV-suppression assay) or stored in liquid nitrogen (intracellular cytokine production). Human leukocyte antigen typing used the complement-dependent microlymphocytotoxic technique (Ingen).

Detection of Intracellular Cytokine Production

Frozen PBMC were thawed in RPMI medium containing 10% fetal calf serum and antibiotics and were stimulated for 15 hours in medium containing the relevant Env, Gag, Pol or Nef optimal peptide pools (1 μ g/mL) according to the subjects' HLA type, or P24 (1 μ g/mL), in the presence of brefeldin A (10 μ g/mL) (Sigma-Aldrich). After incubation, samples were stained for viability with the LIVE/DEAD® Fixable Violet Dead Cell Stain kit (Invitrogen) and then with the following antibodies to quantify cytokine production in CD8+ and CD4+ T-cells: anti-IL-2-phycoerythrin (PE), -MIP-1 β -peridin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), -CD3-PE-cyanin 7 (PE-Cy7), -IFN- γ -allophycocyanin (APC) and -CD8-APC-H7 (Becton Dickinson). A negative control (medium) and a positive control (staphylococcal enterotoxin B, SEB) were included in each experiment. Samples were acquired on a BD LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with DIVA software (Becton Dickinson).

Measurement of CD8 T-cell-mediated HIV Suppression *ex vivo*

The method used to assess the capacity of CD8+ T-cells to suppress HIV-1 infection of autologous CD4+ T-cells *ex vivo* is described in detail in [16]. Briefly, CD4 and CD8+ T cells were isolated from freshly purified PBMC by, respectively, positive and negative magnetic bead-sorting (Stemcell Technologies). CD4+ cells were activated with phytohemagglutinin (1 μ g/ml) and IL-2 (100 UI/ml) for three days. CD4+ T cells were then infected *in vitro* with HIV-1 BaL using a spinoculation protocol [17] and cultured alone or co-culture with autologous CD8+ T cells at a 1:1 ratio. Non superinfected CD4+ T cells were also cultured in parallel to assess replication of autologous virus. Viral replication was measured by p24 production in culture supernatants by ELISA (Zeptometrix). The index of *in vitro* superinfection for each experiment was determined by comparing the peak level of p24 in culture supernatants of PHA-activated CD4+ T cells infected *in vitro* with HIV-1 BaL to that

Table 1. Characteristics of groups of patients included in the study.

Characteristics (median [IQR])	PHI ¹ patients from ANRS OPTIPRIM trial	HIC ² from ANRS CO18 cohort
Number of patients	50	46
Days since infection	35 [31–43]	>1825
Fiebig Stage	IV [III–V]	NA ³
HLA		
% of B*27 patients	2	9
% of B*57 patients	2	35
Age	38 [28–47]	46 [40–52]
Log HIV RNA VL (copies/ml)	5.42 [4.99–5.88]	<1.6[<1.3–1.7]
CD4 T cells (cells/μl)	466 [362–652]	841 [759–1114]
CD8 T cells (cells/μl)	1124 [715–1654]	840 [640–1018]

¹PHI, Primary HIV Infection;²HIC: HIV controllers;³NA: not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0059767.t001

of culture supernatants of PHA-activated CD4⁺ T cells not exposed to HIV-1 BaL. Capacity of CD8⁺ T cells to suppress HIV infection was calculated as the Log drop in p24 production when superinfected CD4⁺ T cells were cultured in presence of CD8⁺ T cells. Experiments were conducted in triplicate with cells from each patient.

Statistical Analyses

The Mann-Whitney rank sum test was used to compare variables between groups. Correlations were evaluated by using simple linear regression analysis and Spearman's rank correlation test. All values given in the text are medians and [IQR]. SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc.-SSI, CA) was used for all analyses.

Results

Robust HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell Responses, Including IL-2 Production, during PHI

We detected HIV-specific CD4⁺ T-cells responding to p24 in 36 (92%) of 39 individuals tested; a median of 0.13% [IQR: 0.03%–0.31%] of CD4⁺ T-cells produced at least one cytokine (IFN γ MIP-1 β and/or IL-2) (Figure 2A and Figure S1A). The most frequent responses were observed for IFN γ and MIP-1 β production, which was observed in 82% of patients (Figure 2A, center). Interestingly, IL-2-producing CD4⁺ T-cells were detected in 31 of the 39 patients tested and represented the largest fraction of responding CD4⁺ T-cells in 13 patients, with a median of 0.01% [0.001–0.21] of CD4⁺ T-cells (Figure 2A, left). Eighteen per cent of all responding cells were able to produce two cytokines (IL-2+ MIP-1 β in 10% of cells and IL-2+ IFN γ in 6% of cells) (Figure 2A, right). None of these patient's CD4⁺ T-cells were able to produce the 3 cytokines simultaneously.

As expected, high frequencies of HIV-specific CD8⁺ T-cells were also detected in all 42 patients studied (median frequency 0.61% [0.24%–1.29%]), along with significant IL-2 responses (90% of patients, median frequency 0.23% [0.03%–0.77%]) (Figure 2B and Figure S1B). Among responding cells, 37% were able to produce at least two cytokines (Figure 2B, right). The highest frequencies concerned nef peptides, followed by gag, pol and env (data not shown).

We then compared these responses to those observed in HIC. Previous analyses of the ANRS HIC cohort have shown that many HIC have strong HIV-specific CD8 T-cell responses, comparable to those observed in viremic patients, as well as preserved T helper responses able to produce IL-2 [9,18]. Frequencies of HIV-specific CD4⁺ T-cells producing IFN γ or IL-2 were similar in PHI patients and HIC (0.03% [0.004%–0.08%] vs 0.06% [0.01%–0.16%] IFN γ -producing CD4⁺ T-cells, respectively; 0.01% [0.001%–0.21%] vs 0.02% [0.01%–0.07%] IL-2-producing CD4⁺ T-cells, respectively) ($P>0.05$ for both comparisons) (Figure 2C). The frequency of IFN γ -producing CD8⁺ T-cells was slightly higher in HIC (Fig 1D) (0.61% [0.27%–2.02%] vs 0.30% [0.12%–0.64%] in PHI patients, $P=0.045$). However, many patients with PHI had frequencies similar to those observed in HIC (Figure 2D). Moreover, no differences were found between PHI patients and HIC in terms of HIV-specific CD8⁺ T-cells able to produce IL-2 (0.23% [0.03%–0.77%] vs 0.09% [0.03%–0.3%], respectively; $P=0.34$).

Thus, most patients with PHI possessed both multifunctional HIV-specific CD8⁺ T-cells and helper CD4⁺ T-cells able to produce IL-2, with no evidence of exhaustion.

CD8⁺ T-cells from most Patients with PHI lack Strong Capacity to Suppress HIV Replication

The capacity of CD8⁺ T-cells to eliminate infected CD4⁺ T-cells is one of the best correlates of viral control in vivo [12,16,19,20]. We thus explored the capacity of purified CD8⁺ T-cells from 48 patients from the ANRS 147 OPTIPRIM study to suppress HIV-1 infection of autologous CD4⁺ T-cells ex vivo.

In general, cells from patients with PHI had poor HIV-suppressive capacity (0.09 [0.01–0.28] log p24 decrease CD4 vs CD8:CD4 1:1 E:T ratio), and were far less potent in this respect than cells from HIC (2.15 [0.83–3.35], $n=32$ HIC, $p<0.001$) (Figure 3A). The difference was still highly significant when HIC carrying the protective allele B*57 or B*27 were excluded from the analysis (1.54 [0.78–3.23], $n=15$ B*27^{neg}B*57^{neg} HIC, $p<0.001$). We have previously shown that the capacity of CD8⁺ T-cells from HIC to suppress HIV infection of autologous CD4⁺ T-cells correlates with the frequency of IFN γ -producing HIV-specific CD8 T-cells [10]. Accordingly, a correlation between HIV suppressive capacity and IFN γ production by HIV-specific CD8⁺ T-cells was observed in the HIC analysed here (Spearman

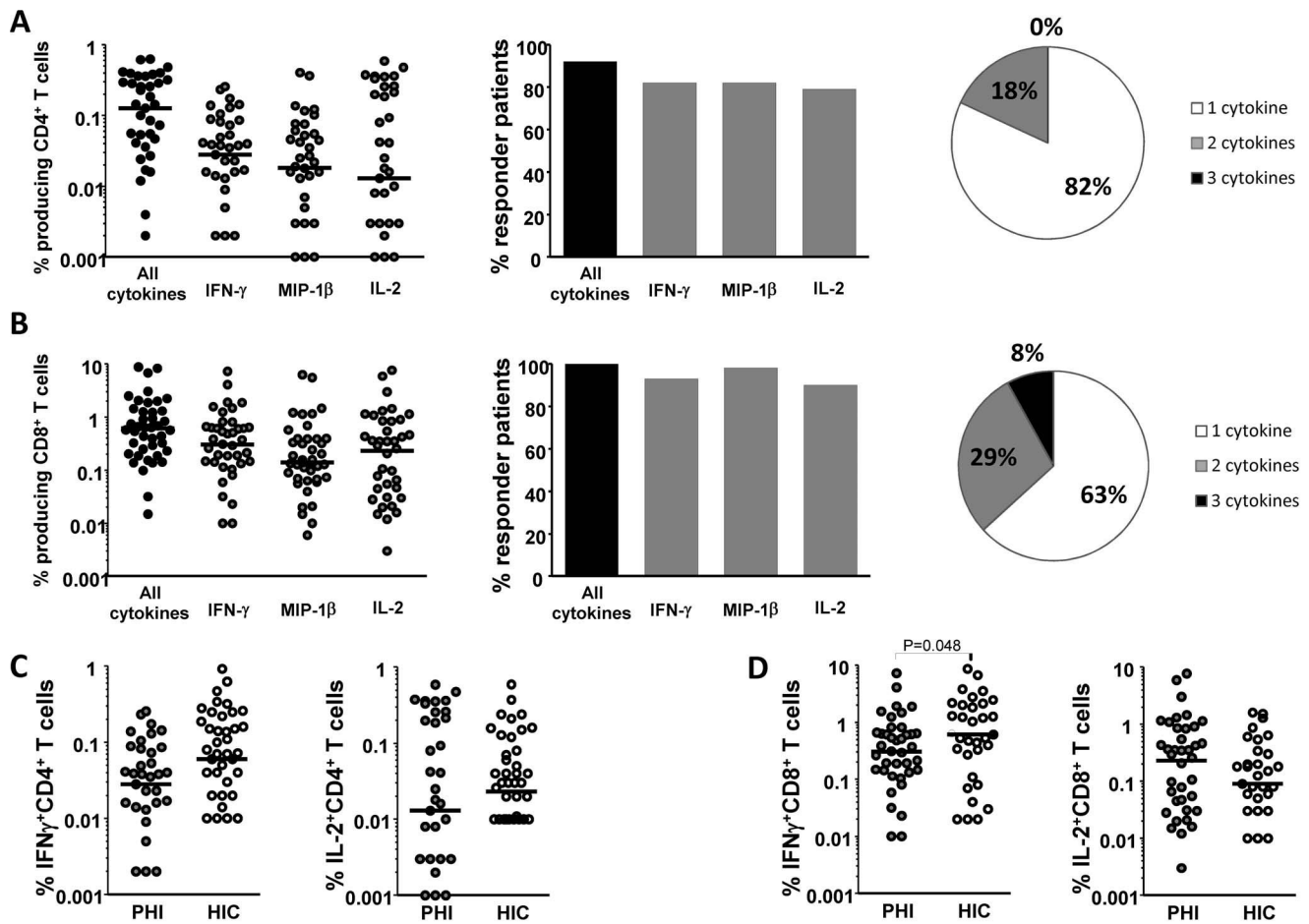


Figure 2. Similar HIV-specific T cell responses in PHI-patients and HIC. **A.** PHI patients: frequency of CD4⁺ T-cells producing at least one cytokine (IFN- γ , MIP-1 β or IL-2) in response to HIV-p24 stimulation, as determined by ICS (left); percentage of patients with a positive CD4⁺ T-cell response (centre); and frequency of HIV-specific CD4⁺ T-cells producing one, two or three cytokines (right). **B.** same experiments with CD8⁺ T-cells challenged with MHC-matched optimal HIV-1 peptides. **C.** Comparative frequency of IFN- γ ⁺ (left) and IL2 (right)-producing CD4⁺ T-cells in PHI patients and HIC. **D.** *Idem* for CD8⁺ T-cells. Each symbol represents one individual. Medians are shown as horizontal lines. doi:10.1371/journal.pone.0059767.g002

0.448, $p=0.015$), while no such correlation was observed in patients with PHI (Spearman 0.003, $p=0.986$) (Figure 3B).

Due to their high viral loads, PHA-activated CD4⁺ T cells from some patients in PHI produced higher levels of p24 than cells from HIC, which may constitute a confounding factor when assessing changes in the levels of superinfection in vitro with HIV-1 BaL. However, the capacity to suppress infection of CD8⁺ T cells from PHI patients for whom viral replication in CD4⁺ T cells after HIV-1 BaL superinfection in vitro was at least three times the one in non superinfected CD4⁺ T cells (superinfection index >3) ($n=29$) (0.2 [0.05–0.42] log p24 decrease CD4 vs CD4:CD8 1:1) was still much weaker than the responses observed in HIC ($p<0.001$) (not shown). These results did not change when a superinfection index above 10 was used to make the analyses. CD8⁺ T cells from HIC had higher viability than cells from PHI patients at the time of co-culture with CD4⁺ T cells (85 [77–92], $n=32$ vs 77 [66–83], $n=42$, $p=0.002$, % of viable cells from HIC and PHI patients respectively). Nevertheless, the capacity of CD8⁺ T cells to suppress HIV-1 infection did not change when we paired cell viability from PHI patients to those from HIC (0.08 [0.0–0.23] log p24 decrease for experiments with cells from PHI patients with 83 [80–87] % of viability, $n=18$).

In general, CD8⁺ T cells from patients in PHI were not totally devoid of capacity to suppress HIV infection, and this tended to be slightly higher in patients whose viral load was declining at the time of the study than in those whose viral load remained stable (Figure 3C). CD8⁺ T-cell-mediated HIV-suppressive capacity during PHI did not correlate with plasma viral load at sampling (Spearman -0.16 , $p=0.28$, not shown). No differences were observed between patients in the acute and early stages of PHI (Figure 3D), and no correlation was found between CD8⁺ T-cell suppressive capacity and the estimated time between infection and inclusion in the study (Spearman 0.09, $p=0.56$, not shown).

CD8⁺ T-cells from two patients with PHI stood out for their strong capacity to suppress HIV-1 infection of autologous CD4⁺ T-cells, at levels similar to those found in HIC (Figure 3A). However, viral load in these two patients was not particularly low when compared to the other PHI patients, and neither patient's HIV-specific T-cells exhibited a particularly high frequency or strong capacity for cytokine production. Neither patient bore the B*27 or B*57 allele. Two other PHI patients bore one of these alleles, but neither of them had a strong CD8⁺ T-cell-mediated capacity to suppress HIV-1 ex vivo (Figure 3A).

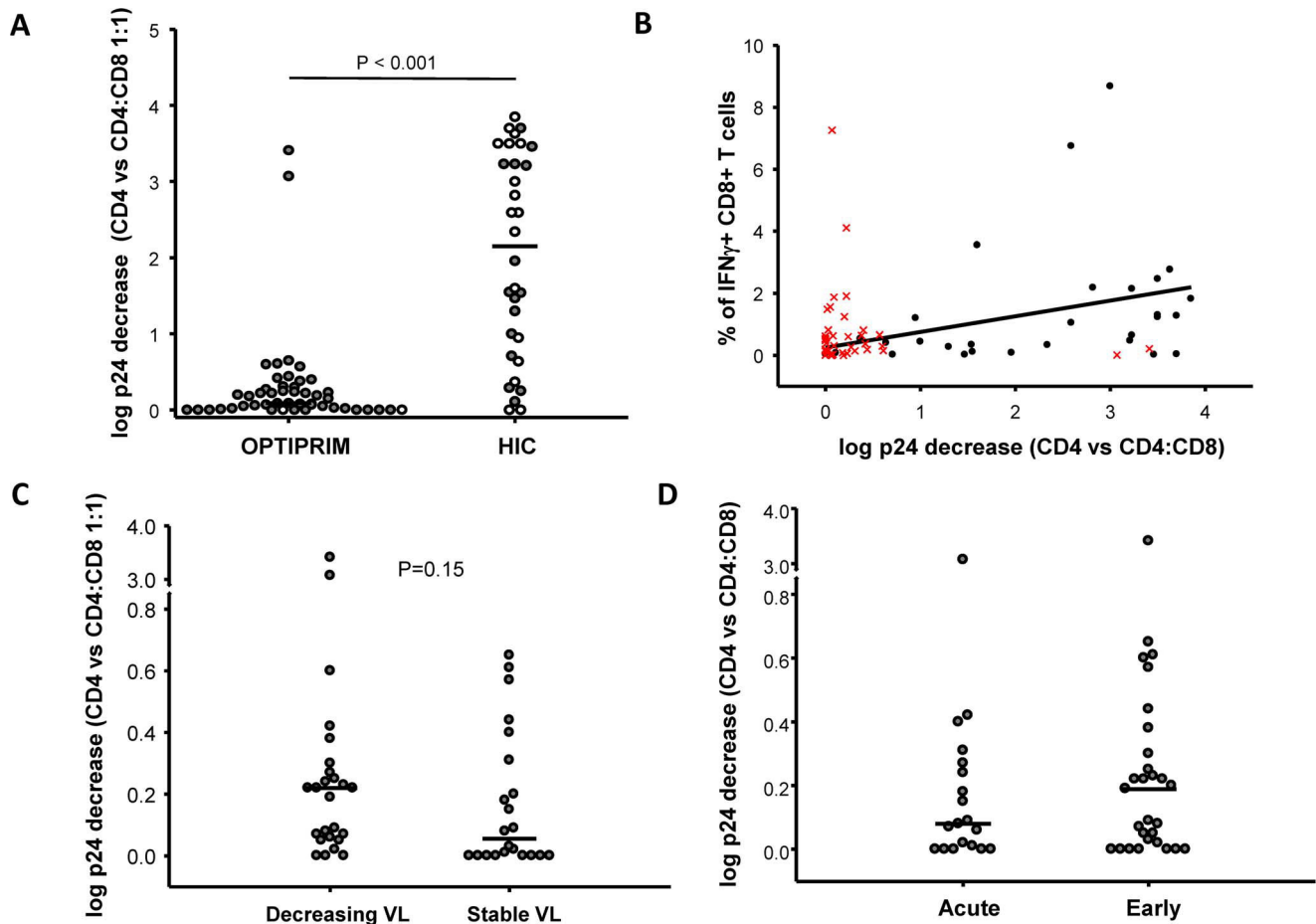


Figure 3. Modest capacity of CD8+ T cells from PHI-patients to suppress infection. **A.** Capacity of CD8+ T-cells from PHI patients and HIC to suppress HIV infection of autologous CD4+ T-cells ex vivo, measured as the log fall in p24 production in culture supernatants when CD4+ T-cells superinfected in vitro with HIV-1 Bal were co-cultured with unstimulated autologous CD8+ T-cells at a ratio of 1:1, by comparison with p24 production by superinfected CD4+ T-cells cultured alone. Each symbol represents one patient. Open circles represent patients carrying at least one HLA-B*27 or B*57 allele. **B.** Correlation between CD8+ T-cell-mediated HIV suppression and the frequency of IFN γ -producing CD8+ T-cells between HIC (black symbols) and PHI patients (red symbols). Linear regression is shown for HIC. **C.** Capacity of CD8+ T-cells from patients with acute or early PHI to suppress HIV infection ex vivo. **D.** Comparison of the capacity of CD8+ T-cells from PHI patients with decreasing and stable viral loads to suppress HIV infection of autologous CD4+ T-cells.

doi:10.1371/journal.pone.0059767.g003

Discussion

Due to their outstanding capacity to spontaneously control HIV infection, HIC are the focus of intense research. Although many HIC lack such responses during chronic infection, it is thought that control of infection in these individuals was achieved, at least in part, thanks to a highly efficient HIV-specific CD8+ T cell response. This response is often considered as a model in the development of T-cell based HIV-vaccines. In particular, the final objective of HIV-specific CD8+ T cells is to eliminate HIV-infected CD4+ T cells, and we and others have found that the CD8+ T cells with the highest capacity to do so are found among HIC. However, the strong potential of CD8+ T cells from these HIC to eliminate infected cells coincide with the preservation of other properties, such as secretion of multiple cytokines (in particular IL-2), which are lost in chronic infection in the cells of non controllers due to uncontrolled-viremia-driven exhaustion. Because no information was available so far about the capacity of CD8+ T cells from HIV infected patients to suppress HIV infection during PHI, it was possible that the strong capacities

found in HIC were just another reflect of a preserved CD8+ T cell response in HIC.

We analyzed the CD8+ T cell response from 50 patients in PHI. Because it is extremely difficult to identify HIC during PHI due to the rarity of this phenotype, we compared these responses to those observed in a group of HIC during chronic infection. Despite comparable frequencies of HIV-specific CD8+ T-cells and CD4+ T helper cells with a preserved capacity to produce IL-2, CD8+ T-cells from the overwhelming majority of patients with primary HIV-1 infection, including those studied during the phase of active viral control, do not exhibit a strong capacity to suppress HIV infection. Actually, strong capacities to suppress HIV infection were only observed in two of the patients included in the study during PHI. Because all these patients immediately started therapy following inclusion, it is unknown whether these two individuals might have been able to spontaneously control infection.

In a recent work, Yang and collaborators have reported that measuring early in infection the capacity of CD8+ T cell to suppress HIV may predict the rate of loss of CD4+ T cells [21]. Although the objective of our work is different of that of Yang

et al, and some differences also exist in the methodology (e.g. time of sampling, CD8:CD4 T cell ratio, patients analyzed), our results provide some support to their observations. Although much weaker than observed in HIC, CD8+ T cells from patients in PHI had some capacity to suppress HIV infection. Interestingly, this capacity tended to be higher in those patients who were experiencing an active decline in their viral loads at the time of sampling. Because of treatment initiation we could not further assess the impact of this capacity in the evolution of infection in this group of patients.

In summary, our results suggest that most HIV infected individuals are not able to develop during PHI CD8+ T cell responses with the superior capacity to suppress HIV infection that is later found in many HIC. We may speculate that this capacity of HIC cells may be established early through the selection/development of cells with particular intrinsic characteristics, such as stronger avidity or more rapid degranulation [12,22].

Supporting Information

Figure S1 Representative example of ICS experiments showing production of IL-2 and IFN γ by CD4+ T cells (A) or CD8+ T cells (B) from a patient in PHI, in the absence

of stimulation or in response to HIV antigens or to SEB superantigen.

(PDF)

Text S1 List of clinical centres and associated clinicians participating in the OPTIPRIM clinical trial.

(PDF)

Acknowledgments

The authors especially thank the subjects who participated in this study for their cooperation, and all the clinicians who cared for the patients in the ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial and CO18 HIV controller cohort (a list can be found as Text S1). We are particularly indebted to Prof. Olivier Lambotte and Dr. Farouly Boufassa for clinical information on HIV controllers.

Author Contributions

Critical reviewing of manuscript: CL IG AC PV GN LM CR GP AV AS-C. Conceived and designed the experiments: AC CR GP AV AS-C. Performed the experiments: CL IG PV. Analyzed the data: CL IG LM GP AV AS-C. Contributed reagents/materials/analysis tools: GN. Wrote the paper: CL AS-C.

References

- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, et al. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology* 68: 4650–4655.
- Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, et al. (1997) Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature medicine* 3: 205–211.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, et al. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283: 857–860.
- Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A (2002) Presence of HIV-1 Gag-specific IFN- γ -IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *Journal of immunology* 169: 6376–6385.
- Youngblood B, Wherry EJ, Ahmed R (2012) Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8 T cells. *Current opinion in HIV and AIDS* 7: 50–57.
- Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, et al. (2004) Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS biology* 2: E20.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, et al. (2002) HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature immunology* 3: 1061–1068.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, et al. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107: 4781–4789.
- Saez-Cirion A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, et al. (2007) HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6776–6781.
- Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, et al. (2009) Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *Journal of immunology* 182: 7828–7837.
- Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, et al. (2008) Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009–1021.
- Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, Demers K, Sheth P, et al. (2010) Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS pathogens* 6: e1000917.
- Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, et al. (2008) HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol* 82: 5398–5407.
- Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, et al. (2008) Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 563–571.
- Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, et al. (2009) Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 182: 7828–7837.
- Saez-Cirion A, Shin SY, Versmisse P, Barre-Sinoussi F, Pancino G (2010) Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses. *Nature protocols* 5: 1033–1041.
- O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH (2000) Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *Journal of virology* 74: 10074–10080.
- Vingert B, Benati D, Lambotte O, de Truchis P, Slama L, et al. (2012) HIV Controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *Journal of virology*.
- Migueles SA, Weeks KA, Nou E, Berkley AM, Rood JE, et al. (2009) Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *Journal of virology* 83: 11876–11889.
- D'Souza MP, Altfield M (2008) Measuring HIV-1-specific T cell immunity: how valid are current assays? *The Journal of infectious diseases* 197: 337–339.
- Yang H, Wu H, Hancock G, Clutton G, Sande N, et al. (2012) Antiviral inhibitory capacity of CD8+ T cells predicts the rate of CD4+ T-cell decline in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 206: 552–561.
- Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, et al. (2009) Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113: 6351–6360.

¶ Membership of the ANRS 147 OPTIPRIM clinical trial is provided in Text S1.

Article III

Impact of intensified cART started during Primary HIV-1 infection: results of the OPTIPRIM-ANRS 147 randomised trial.

Chéret. A, G. Nembot, A. Mélard, C. Lascoux, C. Lécuroux, L. Slama, P. Miaillhes, P. Yeni, B. Hoen, I. Ravaux, V. Avettand-Fenoel, C. Goujard, A. Venet, ML. Chaix, C. Tamalet, JM. Molina, C. Katlama, F. Raffi, J. Reynes, A. Lafeuillade, S. Abel, JF. Delfraissy, L. Meyer, C. Rouzioux, for the OPTIPRIM ANRS Study Group.

Manuscrit soumis pour publication au journal *LANCET*

Présentation orale, JNI, juin 2013, Faut-il traiter en primo-infection ?

Présentation orale des résultats préliminaires, *IAS July 2013, Kuala Lumpur Abstract WEAB01*

Présentation orale des résultats préliminaires *Symposium HIV Cure July 2013, Kuala Lumpur, Abstract OA4-1*

Poster présenté à la *CROI March 2014, Boston, Late braker Abstract #2847*

Communication orale JNI, Juin 2014 Bordeaux, N°533

Objectifs

Cet article présente les résultats princeps de l'essai **OPTIPRIM** dont le rationnel a été développé précédemment page 66 et 67, essai pour lequel la méthodologie et les analyses statistiques ont été assurées par l'équipe du service d'épidémiologie du Professeur Laurence Meyer à l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre (INSERM U 1018).

Principaux résultats

90 patients ont été rapidement inclus pour la majorité en moins de 16 mois. Ils étaient symptomatiques (96%) avec des niveaux élevés d'ADN-VIH, médiane à 3,60 (IQR : 3,35–4,02) log copies/10⁶PBMC, d'ARN-VIH, 5,40 (4,90–5,88) log copies/ml et une diminution des T CD4 472 (368–640) cellules/mm³. Les participants étaient traités dans les 35,5 (30–43) jours suivant la contamination et 42 % présentaient une primo-infection aigüe. Après 24 mois de traitement, les niveaux d'ADN-VIH, d'ARN-VIH et de T CD4 sont similaires en intention de traiter et en per protocole. La décroissance d'ADN-VIH est pour l'ensemble des patients de -1,44 (-1,77; 1,03) log copies/10⁶PBMC. De plus, la pente d'ADN-VIH est maintenue jusqu'à M24 de traitement. Le gain de T CD4 est de 223 (95-453) dans le bras 1 (pentathérapie) et 211 (96-359) dans le bras 2 (trithérapie) avec un ratio CD4/CD8 > 1 dans les 2 bras. 91 % des patients ont une charge virale indétectable dans le bras 1 *versus* 93 % dans le bras 2.

Une cinétique paradoxale de la charge virale est observée avec tout d'abord 60 % des patients du bras 1 qui présentent une charge virale < 50cp/ml *versus* 31% dans le bras 2 (p= 0,01) à M3, puis inversement, un moins bon contrôle viral dans le bras 1 *versus* 2 à M6, M12 et M18 respectivement: 71% *versus* 89%, 78% *versus* 96%, 82% *versus* 96% (p<0,05). Deux effets indésirables graves liés au traitement sont survenus dans le bras trithérapie (pancréatite, lipodystrophie) et l'étude de l'observance rapporte une plus grande difficulté de prise dans le bras pentathérapie qui n'est pas corrélée à la charge virale.

Six mois après l'arrêt du traitement 33/63 des patients n'ont pas repris une HAART selon les critères du protocole (ARN-VIH > 50 000 copies/ml, T CD4 < 500/mm³ et < 30%). Enfin, 2 patients (bras trithérapie) maintiennent une charge virale plasmatique <400 cp/ml 12 mois après l'interruption du traitement dont un avec une charge virale plasmatique > 50 copies/ml le définissant comme très probable contrôleurs post arrêt de traitement (PTC).

Discussion

Dans l'essai **OPTIPRIM** nous avons démontré qu'il n'y avait aucun bénéfice additionnel à utiliser en primo-infection la pentathérapie. Aussi, une première hypothèse peut être que la décroissance de l'ADN-VIH est maximale avec la trithérapie utilisée en raison de son inefficacité sur les cellules infectées quiescentes déjà établies. Les effets immunologiques et sur le contrôle virologique après 24 mois de traitement sont remarquables, avec un effet du raltégravir sur la rapidité de décroissance de l'ARN-VIH à 3 mois de traitement. Néanmoins, ce bénéfice s'estompe dans les mois suivants, du fait de la persistance d'une réplication virale à faible niveau (entre 50 et 400 copies/ml) dans le bras pentathérapie. Ce résultat paradoxal pourrait être lié à des interactions pharmacologiques entre les cinq molécules, bien que cela n'ait jamais été rapporté. Ce résultat peut aussi être lié aux effets versatiles immunomodulateurs du maraviroc sur le *trafficking* cellulaire qui est un sujet de controverses actuellement [468, 491, 492]. En conséquence, cela pourrait avoir supprimé le bénéfice lié à la première diminution rapide de l'ARN-VIH, antagonisant les effets du raltégravir. Ainsi, la réplication persistante pourrait avoir limité la décroissance du réservoir en induisant un faible remplissage mais continu de ce dernier et en limitant la restauration du nombre de lymphocytes T CD4.

Nous confirmons dans un essai randomisé, le concept qu'un traitement initié en primo-infection peut induire un contrôle virologique strict à plus ou moins long terme. La pente de décroissance de l'ADN-VIH observée encore à M24, montre qu'un traitement au-delà de deux ans permettrait de poursuivre cette décroissance des réservoirs et de probablement augmenter en primo-infection le nombre de PTC. Les résultats de cet essai seront à prendre en compte pour l'élaboration de futurs essais visant à réduire le réservoir pour une rémission soutenue.

Impact of intensified cART started during Primary HIV-1 infection: results of the OPTIPRIM-ANRS 147 randomised trial.

A. Chéret^{1, 2}, G. Nembot³, A. Mélard^{1, 4}, C. Lascoux⁵, L. Slama⁶, P. Mialhes⁷, P. Yeni⁸, S. Abel⁹, V. Avettand-Fenoel^{1, 4}, A. Venet¹⁰, ML. Chaix^{1, 4}, JM. Molina^{5, 11}, C. Katlama¹², C. Goujard^{3, 13}, C. Tamalet¹⁴, F. Raffi¹⁵, A. Lafeuillade¹⁶, J. Reynes¹⁷, I. Ravaux¹⁸, B. Hoen¹⁹, JF. Delfraissy¹³, L. Meyer^{3*} and C. Rouzioux^{1, 4*}, for the OPTIPRIM ANRS Study Group.

* Both authors equally contributed to the work

1 - EA 7327 Paris Descartes Sorbonne-Paris-Cité University, France

2 - Infectious Diseases Department, Tourcoing Hospital, France

3 - INSERM U1018, Faculty of Medicine, Paris-Sud University, AP-HP Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France

4 - Virology laboratory, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France

5 - Infectious Diseases Department, AP-HP, Saint-Louis Hospital, Paris, France

6 - Infectious Diseases Department, AP-HP, Tenon Hospital, Paris, France

7 - Infectious Diseases Department, Croix Rousse Hospital, Lyon, France

8 - Infectious Diseases Department, AP-HP, Bichat Claude-Bernard Hospital, Paris, France

9 - Infectious Diseases Department, CHU, Fort de France, France

10 - INSERM U1012 Faculty of Medicine, Paris-Sud University, Le Kremlin-Bicêtre, France

11 - INSERM U941 University of Paris Diderot Paris 7, Sorbonne Paris Cité, France

12 - Infectious Diseases Department, AP-HP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

13 - Internal Medicine and Infectious Diseases Department, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France

14 - Virology Laboratory, AP-HM, La Timone Hospital, Marseille, France

15 - Infectious Diseases Department, Hôtel-Dieu Hospital, Nantes, France

16 - Infectious Diseases Department, Font-Pré Hospital, Toulon, France

17 - Infectious Diseases Department, Gui de Chauliac Hospital, Montpellier, France

18 - Infectious Diseases Department, AP-HM, La Timone Hospital, Marseille, France

19 - Infectious Diseases Department, CHU Ricou Hospital, Pointe à Pître, France

Corresponding author:

Dr Antoine Chéret, *EA 7327 Paris Descartes Sorbonne-Paris-Cité University.*

Address: Laboratoire de Virologie, Hôpital Necker EA 7327 Université Paris Descartes 149
rue de Sèvres 75015 - Paris, France

E-mail: antoinecheret@free.fr.

Acknowledgements:

Funding for this work was provided by ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales), which also received financial support from ViiV Healthcare, Gilead, Janssen and Merck. We particularly thank the OPTIPRIM study participants and investigators for their valuable contribution. We also wish to thank Ingrid Bénard, Céline Chaillot, Theodora Harambure for the monitoring of the data, Sandrine Couffin-Cadiergues and Juliette Saillard from the Clinical Research Department at ANRS and David Young for editing the manuscript.

SUMMARY

Background Early cART initiation at the time of primary HIV-1 infection could limit the establishment of HIV reservoirs. The randomized, open-label multicenter OPTIPRIM-ANRS-147 trial was designed to evaluate the impact on total HIV-DNA levels in PBMC, of an early 24-month treatment including raltegravir, maraviroc, darunavir/r and tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine (arm 1), by comparison with darunavir/r and tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine (arm 2).

Methods Inclusion criteria were an incomplete HIV-1 western-blot (WB, ≤ 4 antibodies) and HIV-RNA positivity. The primary endpoint was the between-arm difference in HIV-DNA levels at M24; cART interruption was recommended at M24 if HIV-RNA was < 50 copies per mL and the CD4 cell count ≥ 500 per mm³ or $\geq 30\%$. Treatment resumption was recommended if HIV-RNA was $\geq 50\,000$ copies per mL, or CD4 < 500 per mm³ and $< 30\%$.

Findings Ninety patients were randomised 1:1 in 2010-2011, of whom 42% had ≤ 1 antibody on WB. Both treatments were well tolerated. At M24, HIV-DNA levels were similar in arm 1: 2.35 IQR [2.05 - 2.50] log₁₀ per million PBMC and arm 2: 2.25 [1.71 - 2.55]. The CD4 cell counts rose similarly in both arms. HIV-RNA kinetic in arm 1 was paradoxical, with a larger decrease than in arm 2 until M3 (< 50 copies per mL in 60% vs. 31%, $p=0.01$), but with a significantly poorer viral control from M6 to M18. At M24, a similar proportion of 91% and 93% of patients had HIV-RNA < 50 copies per mL. Two patients (one per arm) were post-treatment controllers (PTC), with HIV-RNA < 400 copies per mL one year after treatment interruption.

Interpretation Two years of an early pentatherapy was not more effective than cART on HIV blood reservoirs. Immuno-modulatory effect of maraviroc might explain the paradoxical HIV-RNA kinetic. We showed, in a randomized trial, that standardized treatment interruption can lead to PTC status.

INTRODUCTION

CART initiation is now recommended in France during Primary HIV-1 infection (PHI)¹, during which the HIV reservoir is established.² The resulting viral invasion is a harmful immune activation whose levels are related to disease progression.³ HIV-DNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) gives an estimation of HIV reservoirs and is predictive of both immunological and clinical outcomes HIV.^{4, 5} Early treatment during PHI may limit the size of HIV reservoirs,⁶ ensure optimal immune restoration⁶ and lessen T cell activation.⁷ Moreover, all so-called Post-Treatment Controllers (PTC) treated at the time of PHI,⁸⁻¹⁰ have very small HIV reservoirs after long-term treatment interruption.

HIV blood reservoirs are generally larger at PHI^{11, 12} than during the chronic phase, but the same first-line drugs are recommended for both situations. One current challenge is to develop treatment strategies for PHI that can block HIV expansion and attenuate the so-called cytokine storm.¹³

The ANRS OPTIPRIM trial was designed to determine whether intensive cART started early during PHI, based on darunavir/ritonavir, tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine, raltegravir and maraviroc, has a bigger impact on HIV reservoir status than the currently recommended triple-drug regimen and could lead to PTC status after interruption of two year treatment. We chose raltegravir for its potent antiviral effect¹⁴ and maraviroc (a CCR5 inhibitor) for both its antiviral activity and its positive impact on the CD4+ cell count.¹⁵

PATIENTS and METHODS

OPTIPRIM was a phase III, randomised, open label, conducted in 33 French centres and involving adult patients presenting with primary HIV-1 infection.

Recruitment began in April 2010 for a planned period of 2 years. The study was approved by the Sud-Méditerranée-1 ethics committee and the French Health Products Safety Agency, and complied with the Helsinki declaration, the French Public Health Code, and French clinical practice guidelines. All the patients gave their written informed consent.

Patients were eligible for the trial if they presented with HIV-1 PHI, with either symptoms or a CD4+ cell count below 500 per mm³. PHI was defined as a positive ELISA with an incomplete Western-blot (≤ 4 antibodies) plus HIV-RNA positivity documented within 8 days before inclusion.¹⁶ The date of infection was estimated as the date of symptom onset minus 14 days or, in asymptomatic patients, the date of the first incomplete Western-blot minus one month.⁵

The main non-inclusion criteria were pregnancy, breast-feeding, HIV-2 infection, ongoing malignancy, cirrhosis, a hepatic aminotransferase or total bilirubin level 10 times the normal upper limit, a prothrombin time <50%, creatinine clearance <60 mL/min, HBsAg positivity, and post-exposure prophylaxis less than six months previously.

Patients were randomly assigned (1:1) to receive either raltegravir 400 mg and maraviroc 150 mg twice daily, plus tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine 300/200 and darunavir/ritonavir 800/100 once daily (arm 1), or tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine 300/200 and darunavir/ritonavir 800/100 once daily (arm 2). To see whether a post-treatment control could be observed within a randomised clinical trial, treatment interruption was proposed at month 24, if the HIV-RNA level was below 50 copies per mL and the CD4+ cell count above 500 per mm³ or 30%. Treatment resumption was recommended when the HIV-RNA level rose above 50 000 copies per mL or the CD4+ cell count fell below 500 per mm³

or 30%. Co-enrolment in the ANRS PRIMO Cohort was proposed to all patients in order to organize post-trial follow-up.

Randomisation

Central computer-generated randomization (1:1) was performed using a predefined randomised list generated by randomly selected variable block sizes.

Procedures

Clinical examinations and laboratory analyses were performed at inclusion and at 1, 3, 6, 12, 18, 24, 25, 26, 28 and 30 months. The HIV-RNA level, CD4 and CD8 T cell counts, blood cell counts and biochemical values were determined locally at each site. Quantification of total cell-associated HIV-DNA was centralised. Thawed whole blood was analysed with an ultrasensitive real-time PCR method (GENERIC HIV-DNA assay, Biocentric, Bandol, France) with a detection limit of 5 copies/PCR.¹⁷ The entire DNA extracts were tested in two to four replicates. Results were reported as the number of HIV-DNA copies per million PBMC, or per million CD4+ cells, or per milliliter of whole blood. Samples taken at M24 were analysed with an ultrasensitive method (HIV-1 RNA Generic Charge Virale, Biocentric); 3 to 5 ml of plasma was ultracentrifuged and tested in two replicates, giving a detection limit of 12 to 5 copies per mL.

Genotypic resistance tests were performed on plasma samples obtained prior to cART initiation, using the AC11 ANRS technique (www.hivfrenchresistance.org). HIV-1 co-receptor usage was predicted by a genotypic method based on the SMV Geno2pheno algorithm (<http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>). HIV-1 subtypes were determined by phylogenetic analysis.¹⁸

The primary endpoint was the difference between the two arms in the HIV-DNA level at month 24 (M24). Other pre-specified endpoints for efficacy at M24 included the comparison of changes in the HIV-DNA level from baseline, of the percentage of patients with plasma HIV-RNA levels below 5 copies per mL, of changes in the CD4+ and CD8+ cell counts, and of evolution from baseline in the percentage of patients with plasma HIV-RNA levels <50 and <400 copies per mL. Two major secondary endpoints were the number of patients in whom HIV-RNA remained <50 copies per mL for 6 months after treatment interruption and the number of post-treatment controllers (<400 copies per mL) 12 months after treatment interruption.

The main safety endpoints were the incidence and severity of adverse events and changes in laboratory parameters. Adverse events were assessed using the ANRS severity scale. An independent Data and Safety Monitoring Board reviewed the data. Other secondary safety endpoints were the incidence of disease progression, and self-reported treatment adherence (ANRS questionnaire) at week 2 and months 1, 3, 6, 12, 18 and 24. The patients were asked whether they had missed doses during the previous 4 days or at least one dose during the previous weekend, and whether they had strictly respected each drug intake during the previous four weeks.

Sample size

Using data from the ANRS C06 PRIMO cohort of patients with PHI¹¹ we calculated that we would need to enrol 90 patients in order to achieve 80% power to detect a difference in HIV-DNA levels of at least 0.5 log₁₀ copies per 10⁶ PBMC between the two arms at M24, at a significance level of 5% in a two-sided test.

Statistical methods

In the intent-to-treat analysis, we used the LOCF method to handle missing data for continuous variables (HIV-DNA, HIV-RNA, CD4+ and CD8+ cell counts), while missing

binary variables (HIV-RNA below 50 or 400 copies per mL) were considered to represent failure. Patients with protocol deviations were analysed in the intent-to-treat analysis as having missing data from the time of the protocol deviation and were excluded from the per protocol analysis. Demographic and clinical characteristics were summarised within each treatment arm in terms of the median and interquartile range (IQR) for continuous variables, frequency and percentage for categorical variables.

Primary endpoint

The Wilcoxon rank test was used to compare the distribution of HIV-DNA levels (\log_{10} per million PBMC) at M24 between treatment arms.

Secondary endpoints

The Wilcoxon rank test was used to analyse the distribution of changes in the HIV-DNA level from baseline to months 1, 3, 6, 12, 18 and 24 between the two arms. The Chi-square test or Fisher's exact test was used to compare the proportions of patients with plasma HIV-RNA <400 and <50 copies per mL in the two arms at months 1, 3, 6, 12, 18 and 24, and the proportion of patients with HIV-RNA <5 copies per mL at M24.

The Wilcoxon rank test was used to compare the distribution of CD4 cell counts and CD4/CD8 ratios at month 24 between treatment arms.

The proportion of patients in whom HIV-RNA remained <400 copies/mL after treatment interruption was estimated by using Kaplan-Meier curves and was compared between the two arms with a log-rank test. Transient blips (>400 copies per mL, immediately followed by return to <400) were not considered as failures.

The SAS software package version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) and STATA/IC for Windows (32-bit) were used for all analyses.

This study is registered with clinicaltrials.gov (n° NCT01033760)

RESULTS

A total of 110 patients were enrolled during a 16-month period, of whom 92 were randomly assigned to a treatment group and 90 started the study treatment (figure 1).

Baseline characteristics

A symptomatic PHI was observed in 87 patients (92.2%), a median of 20 days after symptom onset. The median time from the estimated date of infection was 35 days (table 1). HIV-1 western-blot confirmed acute PHI in 42% of cases, with ≤ 1 antibody. Genotypic studies showed no ARV resistance, apart from raltegravir resistance (157Q integrase mutation) in one patient in arm 2.

Changes in HIV-DNA levels

At M24, there was no significant difference in total HIV-DNA levels between the treatment arms, with median values of 2.35 (IQR: 2.05 - 2.50 \log_{10} copies per 10^6 PBMC, figure 2A) in arm 1 and 2.25 (IQR: 1.71 – 2.55 \log_{10} copies per 10^6 PBMC) in arm 2 (table 2) ($p=0.21$). Similar results were obtained when HIV-DNA was expressed per mL of blood (figure 2B) or per 10^6 CD4 T cells, and also in the per protocol analysis. The largest decrease occurred during the first three months: at month 3 the median change from baseline was -0.75 per 10^6 PBMC overall, with no difference between the arms (figure 2C). HIV-DNA levels continued to decline until M24, with similar slopes in both arms. The respective declines from baseline in HIV-DNA were -1.26 and -1.24 \log_{10} copies per 10^6 PBMC at M12 and -1.41 and -1.44 \log_{10} copies per 10^6 PBMC at M24 (figure 2C, 2D).

Changes in HIV-RNA levels and CD4 T cell counts

The percentage of patients with HIV-RNA <50 copies per mL at month 24 was similar in the two arms (91.1% and 93.3%, respectively), as was the percentage of patients with HIV-RNA <5 copies per mL (71.1% and 68.9%, respectively). At M3, HIV-RNA levels were <50 copies

per mL in 60% of patients in arm 1 and 31% in arm 2 ($p=0.01$) (figure 3A). Conversely, the percentage of patients with HIV-RNA <50 copies per mL was significantly lower in arm 1 than in arm 2 from M6 to M18 (71% vs. 89%, 78% vs. 96% and 82% vs. 96% at M6, M12 and M18, respectively). In arm 1, HIV-RNA values were between 400 and 5000 copies per mL in one patient at M6 and one patient at M18 (figure 3B), whereas all values in the remaining subjects whose HIV-RNA remained >50 copies per mL from M6 were <400 copies per mL. The CD4 T cell count rose with a rapid initial gain during the first three months in both arms. At M24 the increase was similar, with median gains from baseline of 223 and 211 cells per mm^3 , respectively, (figure 3C). The CD4/CD8 ratio was also similar in both arms and median values were >1 (table 2).

Safety and adherence

The mean duration of study drug exposure was similar in both arms (table 3). Most adverse events were grade 1 or 2. Two patients stopped the study treatment prematurely at M12: a pregnant woman in arm 1, and a man in arm 2 due to severe lipodystrophy. Biological abnormalities were also similar. Small increases in serum creatinine (grade 1) occurred in two patients in arm 1 and three in arm 2. Two patients in arm 1 had grade 3 hypophosphatemia. Grade 3-4 clinical adverse events affected 7 patients in each arm. Three serious clinical adverse events occurred: two in arm 2 (pancreatitis and lipodystrophy) were considered treatment-related, and one in arm 1 (suicide attempt) was considered unrelated to the study treatment. The proportion of patients who stated having taken their entire prescribed dose of treatment during the previous 4 days did not differ between the two arms, although there was a trend towards lower adherence in arm 1 than in arm 2 at M12 (82% vs. 95%, $p=0.08$). The proportion of patients who stated they had not missed a dose during the previous weekend was at least 90% at all visits except in arm 1 at M18 (87% vs. 100%, $p=0.02$) and month 24 (82% vs. 93%, $p=0.18$). The proportion of patients who stated they had strictly followed each drug intake during the previous 4 weeks tended to be lower in arm

1 than in arm 2, with a significant difference at M24 (56% vs. 81%, $p=0.01$), and a trend at M12 (67% vs. 84%, $p=0.07$). No significant relationship was found in either arm between the proportion of patients with undetectable HIV-RNA and the different measures of adherence.

Follow-up after month 24

At M24, only four patients (two in each arm) had not reached the treatment interruption criteria. Among the 37 eligible patients in arm 1 and the 41 eligible patients in arm 2, 29 and 34 patients agreed to stop their treatment, respectively. Of these, 19 and 11 patients resumed treatment within 6 months respectively (figure 4).

Six months after treatment interruption (at M30), viral load remained <400 copies per mL in four untreated patients (one in arm 1 and three in arm 2), and <50 copies per mL in one of them (in arm two). Twelve months after treatment interruption, two patients resumed treatment without protocol criteria and two patients (one in each arm) still maintained a viral load <400 copies per mL (log rank test $p=0.62$) (figure 5A), defining them as PTC. The two patients were men infected by HIV-1 subtype B with R5 viral tropism, and neither of them possessed protective HLAB-27/B-57 alleles. In Patient #1, HIV-RNA still remained below 50 copies per mL 18 months after treatment interruption. Viral load in the patient #2 fluctuated between 50 and 400 copies per mL after treatment interruption, reaching 530 copies per mL after 18 months (figure 5B, 5C).

DISCUSSION

Compared to early standard cART, early intensive cART including raltegravir and maraviroc had no additional impact on HIV-DNA level after 24 months of treatment. A marked decline in the size of HIV-blood reservoirs was noted at M24 in both arms, larger than previously reported notably in chronic treated patients.¹⁹ At month 12 the decline in the HIV reservoir was -1.33 and -1.25 log₁₀ copies per 10⁶ PBMC compared to 0.75 in the Quest study.²⁰ Of note, most of our patients were recruited at the time of symptomatic PHI and therefore had high HIV-DNA and HIV-RNA levels at treatment initiation.¹¹

The strong impact of both cART regimens on the HIV reservoir might have been due to the very potent backbone of darunavir and tenofovir-disoproxil-fumarate/emtricitabine. As cART does not eradicate infected T cells that are already quiescent early during PHI, it is possible that the maximum of HIV-DNA decrease has been nearly reached with this triple therapy. This strong impact was also noted on viral load, with viral load suppression (<50 copies per mL) at M24 in more than 90 % of patients in both arms. Similarly, the CD4+ cell count rose rapidly and the median CD4+/CD8+ ratio was above 1 in both arms. The tolerability was good, with only two treatment-related serious adverse effects in arm 2.

The 90 patients were rapidly enrolled within less than 16 months and all accepted to participate despite a short delay to consent to enter the trial and initiate treatment. Thus, this very early treatment initiation was well accepted, even at this critical period of starting life with HIV. Treatment adherence was satisfactory in both arms, despite being slightly less so in the pentatherapy arm. Follow-up rate was very good in both arms, with 91% of the patients still on per-protocol at M24. Two patients, one in each arm, who maintained viral control (<400 copies per mL) 12 months after treatment interruption, met the definition of a post-treatment controller, particularly the one who had HIV-RNA <50 copies per mL for more than 18 months.¹⁰

Despite these good outcomes at M24, the changes in HIV-RNA levels in the pentatherapy arm were somewhat paradoxical. HIV-RNA levels declined more rapidly than in the triple therapy arm during the first three months, possibly due to the presence of raltegravir, as previously reported in chronically infected patients.²¹ Surprisingly, this superiority did not persist, with a higher percentage of patients in the pentatherapy arm until 18 months presenting with a low viremia >50 copies per mL. There are several possible explanations for this result. First, we cannot exclude that a lower adherence in arm 1 due to a twice a day prescription versus once a day in arm 2 could be implied, although we did not observe relationship between self-reported adherence and current viral load response. Secondly, it is conceivable that previously unidentified pharmacological interactions interfered with the efficacy of the five-drug regimen. Another possibility is a transient and versatile effect of maraviroc on immune cell trafficking, through CCR5 blockade. This impact of maraviroc on immune activation is controversial.²²⁻²⁴ Moreover, Maraviroc has been shown to induce persistent low-level viral replication *in vitro*.²⁵ In our study, any such immuno-modulatory effect of maraviroc would have diminished over time, as a majority of patients had HIV-RNA <50 copies per mL at M24. Maraviroc was used for two years at the time of PHI that means in the context of a skewed immune homeostasis.²⁶ Consequently, this might have deleted the expected benefit of the first rapid HIV-RNA decrease, thus counteracting the effect of raltegravir, by maintaining a low viral replication and limiting the reservoir decrease.²⁷ Interestingly, a similar trend for a lower HIV-RNA decrease was found in a recently publication by Markowitz et al., which was found to be non-significant, likely due to a smaller sample size.²⁸

Treatment interruption is not generally recommended in HIV infection, but we observed no deleterious effects since treatment resumption was similarly effective. This is the first demonstration in a randomised trial that a standardized treatment interruption can lead to a VISCONTI post-treatment controller status.¹⁰ Moreover, the continuous decline in HIV-DNA observed until M24 indicates that a more prolonged cART effect on HIV reservoirs should be

beneficial for all patients treated at PHI. Together, these results should help to guide antiretroviral treatment initiated at the time of primary HIV infection and contribute to design novel trials aiming at decreasing HIV reservoir towards an HIV life-long remission.

Role of the funding source

The study was sponsored by ANRS. ViiV Healthcare, Gilead, Janssen and MSD acted as co-sponsors through an ANRS contract. All the authors accept responsibility for the veracity and completeness of the data reported. The corresponding author had final responsibility for the decision to submit for publication.

OPTIPRIM Scientific Committee: Brigitte Autran, Marie-Laure Chaix, Antoine Chéret, Sandrine Couffin-Cadiergues, Cécile Goujard, Bruno Hoen, Caroline Lascoux-Combe, Camille Lécuroux, Annie Le Palec, yann Mazens, Laurence Meyer, Georges Nembot, Daniel Olive, Gianfranco Pancino, Isabelle Ravaux, Christine Rouzioux, Assia Samri, Asier Saez-Cirion, Juliette Saillard, Bruno Spire, Catherine Tamalet, Jean-Marc Tréluyer, Alain Venet, Yann Mazens.

REFERENCES

1. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH, recommandations du groupe d'experts sous la direction du Professeur P. Morlat. La documentation Française. Paris : 2013. 476 p. URL: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf (Consulté le 30 Mars 2014).
2. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**(15): 8869-73.
3. Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, Mlisana K, et al. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *Aids*. 2010; **24**(6): 819-31.
4. Rouzioux C, Hubert JB, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, et al. Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *J Infect Dis*. 2005; **192**(1): 46-55.
5. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, et al. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin Infect Dis*. 2006; **42**(5): 709-15.
6. Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Melard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*. 2013; **68**(5): 1169-78.
7. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, et al. Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J Infect Dis*. 2013; **208**(8): 1202-11.
8. Lodi S, Meyer L, Kelleher AD, Rosinska M, Ghosn J, Sannes M, et al. Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion. *Arch Intern Med*. 2012; **172**(16): 1252-5.
9. Goujard C, Girault I, Rouzioux C, Lecuroux C, Deveau C, Chaix ML, et al. HIV-1 control after transient antiretroviral treatment initiated in primary infection: role of patient characteristics and effect of therapy. *Antivir Ther*. 2012; **17**(6): 1001-9.
10. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*. 2013; **9**(3): e1003211.
11. Ghosn J, Deveau C, Chaix ML, Goujard C, Galimand J, Zitoun Y, et al. Despite being highly diverse, immunovirological status strongly correlates with clinical symptoms during primary HIV-1 infection: a cross-sectional study based on 674 patients enrolled in the ANRS CO 06 PRIMO cohort. *J Antimicrob Chemother*. 2010; **65**(4): 741-8.
12. Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *Aids*. 2011; **25**(7): 885-97.
13. Bell SK, Little SJ, Rosenberg ES. Clinical management of acute HIV infection: best practice remains unknown. *J Infect Dis*. 2010; **202 Suppl 2**: S278-88.
14. Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; **46**(2): 125-33.
15. Cooper DA, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, DeJesus E, et al. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2010; **201**(6): 803-13.
16. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*. 2003; **17**(13): 1871-9.

17. Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol*. 2009; **81**(2): 217-23.
18. Felsenstein J. An alternating least squares approach to inferring phylogenies from pairwise distances. *Syst Biol*. 1997; **46**(1): 101-11.
19. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, et al. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *Aids*. 2004; **18**(1): 45-9.
20. Hoen B, Cooper DA, Lampe FC, Perrin L, Clumeck N, Phillips AN, et al. Predictors of virological outcome and safety in primary HIV type 1-infected patients initiating quadruple antiretroviral therapy: QUEST GW PROB3005. *Clin Infect Dis*. 2007; **45**(3): 381-90.
21. Murray JM, Emery S, Kelleher AD, Law M, Chen J, Hazuda DJ, et al. Antiretroviral therapy with the integrase inhibitor raltegravir alters decay kinetics of HIV, significantly reducing the second phase. *Aids*. 2007; **21**(17): 2315-21.
22. Puertas MC, Massanella M, Llibre JM, Ballester M, Buzon MJ, Ouchi D, et al. Intensification of a raltegravir-based regimen with maraviroc in early HIV-1 infection. *Aids*. 2013.
23. Hunt PW, Shulman NS, Hayes TL, Dahl V, Somsouk M, Funderburg NT, et al. The immunologic effects of maraviroc intensification in treated HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T-cell recovery: a randomized trial. *Blood*. 2013; **121**(23): 4635-46.
24. Cuzin L, Trabelsi S, Delobel P, Barbuat C, Reynes J, Allavena C, et al. Maraviroc intensification of stable antiviral therapy in HIV-1-infected patients with poor immune restoration: MARIMUNO-ANRS 145 study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; **61**(5): 557-64.
25. Kramer VG, Schader SM, Oliveira M, Colby-Germinario SP, Donahue DA, Singhroy DN, et al. Maraviroc and other HIV-1 entry inhibitors exhibit a class-specific redistribution effect that results in increased extracellular viral load. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; **56**(8): 4154-60.
26. Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoel V, Nembot G, Melard A, Blanc C, et al. A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4+ cell subsets within one month post-infection. *PLoS One*. 2013; **8**(5): e64219.
27. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev*. 2013; **254**(1): 326-42.
28. Markowitz M, Evering TH, Garmon D, Caskey M, La Mar M, Rodriguez K, et al. A Randomized Open-Label Study of Three- versus Five-Drug Combination Antiretroviral Therapy in Newly HIV-1 Infected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014.

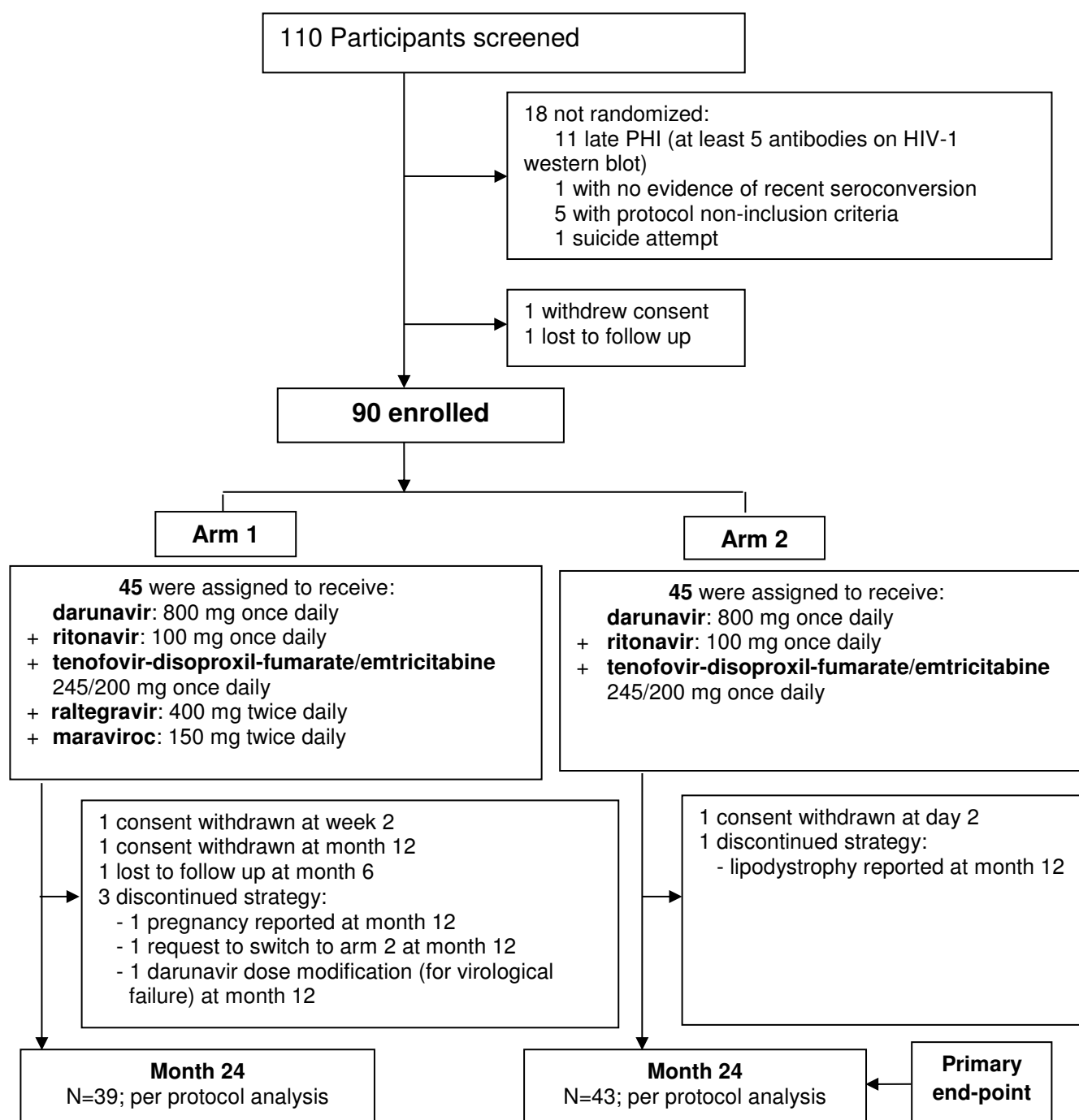


Figure 1: Trial profile

	Arm 1 (n=45) Pentatherapy	Arm 2 (n=45) Triple drug-HAART	Total (n=90)
DEMOGRAPHICS			
Men, n (%)	43 (95.6 %)	40 (88.9 %)	83 (92.2 %)
MSM, n (%)	33 (73.3 %)	35 (77.8 %)	68 (75.6 %)
Median age, years (IQR)	36 (30 – 47)	35 (26 – 43)	35 (28 – 44)
Country of birth, n (%)			
France/Europe	37 (82.2 %)	34 (75.6 %)	71 (78.9 %)
Sub saharan Africa	4 (8.9 %)	2 (4.4 %)	6 (6.7 %)
Others	4 (8.9 %)	9 (20 %)	13 (14.4 %)
BASELINE CHARACTERISTICS			
Symptomatic primary infection, n (%)	43 (95.6%)	44 (97.8 %)	87 (96.7 %)
Acute primary infection, n (%)	17 (37.8%)	21 (46.7 %)	38 (42.2 %)
Median time between PHI and enrolment (days) (IQR)	20 (14 – 28)	20.5 (12 – 28.5)	20 (13 – 28)
Median time between estimated date of infection and enrolment (days) (IQR)	35 (30 – 42)	36 (31 – 44)	35.5 (30 – 43)
Median CD4 count, cells per mm ³ (IQR)	481 (356 – 653)	471 (388 – 604)	472 (368 – 640)
Median CD8 count, cells per mm ³ (IQR)	1227 (697 – 1797)	1108 (793 – 1550)	1135.5 (750 – 1772)
Median CD4/CD8 ratio	0.39 (0.26 – 0.72)	0.45 (0.28 – 0.68)	0.42 (0.26 – 0.72)
Median HIV-1 RNA (log ₁₀ copies per mL) (IQR)	5.53 (4.99 – 6.04)	5.20 (4.81 – 5.80)	5.40 (4.90 – 5.88)
Median HIV-1 DNA (log ₁₀ copies per 10 ⁶ PBMC) (IQR)	3.66 (3.41 – 4.06)	3.52 (3.26 – 3.94)	3.60 (3.35 – 4.02)
HIV-1 subtype, n (%)			
B	31 (68.9 %)	27 (60 %)	58 (64.4 %)
non B	14 (31.1 %)	18 (40 %)	32 (35.6 %)
HIV-1 tropism, n(%)			
CCR5	43 (95.5 %)	38 (84.4 %)	81 (90 %)
CXCR4	2 (4.4 %)	7 (15.5 %)	9 (10%)
Genotypic resistance to the drug regimen	0	1 (Raltegravir)	1 (Raltegravir)
Acute HIV infection was defined by less than one band to the HIV western-blot One HIV-DNA level was missing due to a non amplifiable HIV-1 N subtype			
Table 1 : Demographic and baseline characteristics			

	Arm 1 (n=45) Pentatherapy	Arm 2 (n=45) Triple drug-HAART
Median HIV-DNA, log ₁₀ copies/10 ⁶ PBMC (IQR)	2.35 (2.05 - 2.50) b	2.25 (1.71 - 2.55)
Median HIV-DNA change, log ₁₀ copies/ 10 ⁶ PBMC (IQR) ^a	-1.41 (-1.61 - (-1.22)) b	-1.44 (-1.75 - (-1.10))
Median HIV-DNA, log ₁₀ copies/10 ⁶ CD4	2.82 (2.56 - 3.06) b	2.77 (2.27 - 3.00)
Median HIV-DNA change, log ₁₀ copies/10 ⁶ CD4	-1.71 (-1.92 - (-1.46)) b	-1.66 (-1.97 - (-1.28))
Median HIV-DNA, log ₁₀ copies/ml blood (IQR)	2.76 (2.38 - 2.91)b	2.61 (2.06 - 2.87)
Median HIV-DNA change, log ₁₀ copies/ml blood (IQR)*	-1.59 (-1.73 - (-1.22)) b	-1.55 (-1.80 - (-1.26))
% patients with plasma HIV-1 RNA <50 copies/ml [95 % CI]	91 [78 - 97]	93 [82 - 98]
Median CD4 count, cells/μL (IQR)	731 (616 - 877)	711 (550 - 858)
Median CD4 count change, cells/μL (IQR) ^a	223 (95 - 453)	211 (96 - 359)
Median ratio CD4/CD8 (IQR)	1.06 (0.82 - 1.38)	1.24 (1.03 - 1.45)
^a between month 24 and baseline ^b n=44		
HIV-1 DNA, HIV-1 DNA change, CD4, CD4 change, ratio CD4/CD8, were compared between arms using Wilcoxon rank test. Proportions of patients with HIV-1 RNA<50 copies/ml were compared between arms using Fisher's exact test. All comparisons between arms were not statistically significant.		
Table 2 : Outcomes at Month 24		

Summary of safety	Arm 1 Pentatherapy N=45	Arm 2 Triple drug- HAART N=45
Mean treatment exposure, weeks (range)	94.6 (4.2 – 105.4)	97.6 (0.2 – 107)
Grade 3 – 4 clinical adverse event (patients)	8(7)	8(7)
Upper respiratory tract infection	2	0
Pulmonary infection	0	2
Gastro intestinal infection	1	0
inguinal lymph infection	0	1
Upper abdominal pain (pancreatitis)* ¹	0	1
Renal colic pain	1	0
Lipodystrophy*	0	1
Secondary syphilis	1	0
Hepatitis C	0	1
Suicide attempt	1	0
Condyloma surgery	1	1
Depression symptoms	1	0
Grade 3-4 laboratory abnormalities		
Alanine aminotransferase (IU/L)	0	1
Creatine Phosphokinase (IU/L)	2	3
Hypophosphatemia (mmol/L)	2	0
gammaGT (UI/L)	1	2
Lipasemia (IU/L)* ¹	0	1
Table 3 : Clinical adverse events and laboratory abnormalities until month 24		
*Serious adverse event at least possibly related to study treatment		
¹ these two events occurred in the same patient		

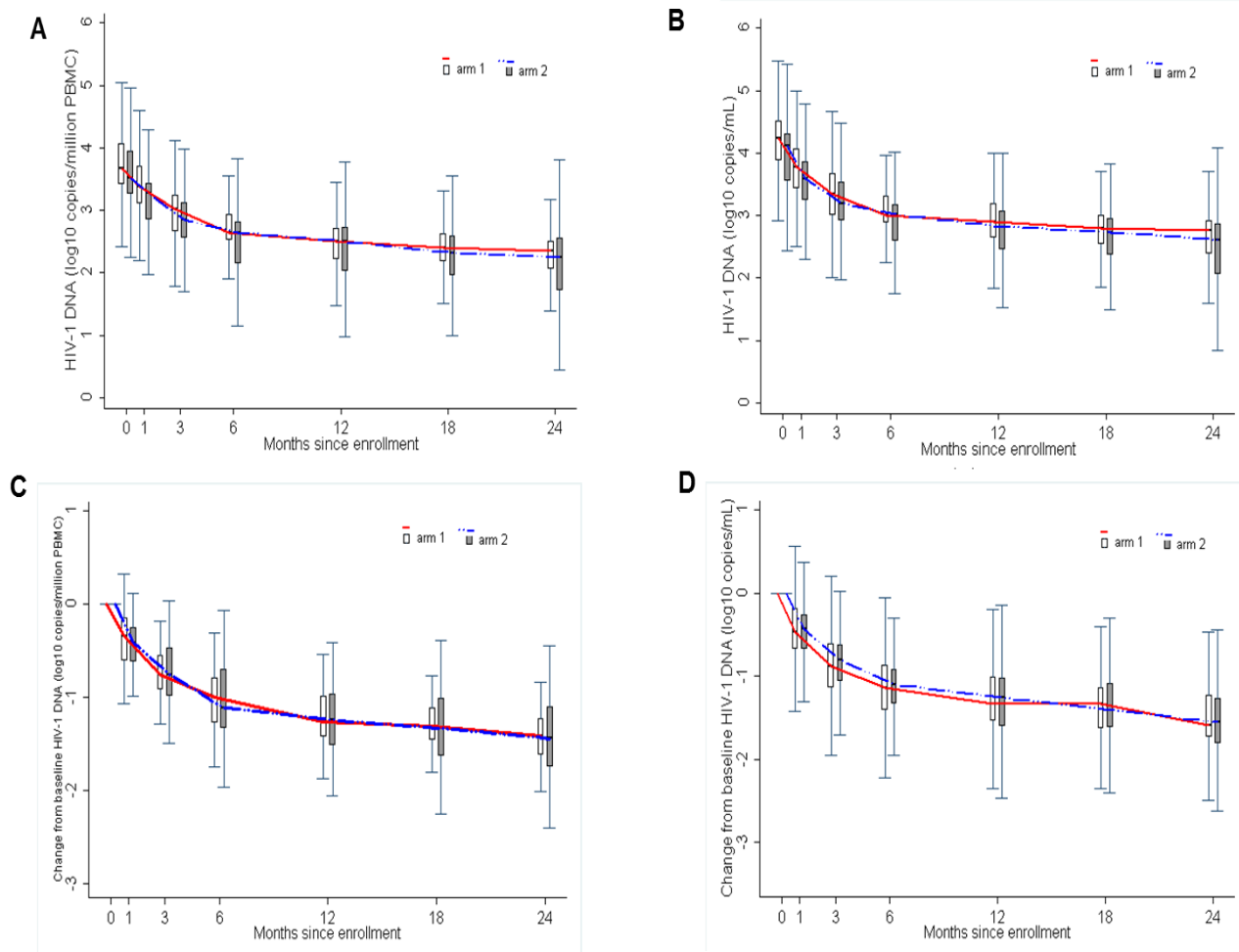


Figure 2: HIV-DNA kinetics from baseline to month 24, Intent-To-Treat analysis, median values, interquartile and range

- A. HIV-DNA (\log_{10} copies/million PBMC)**
- B. HIV-DNA (\log_{10} copies/mL blood)**
- C. Change in HIV-DNA (\log_{10} copies/million PBMC) from baseline**
- D. Change in HIV-DNA (\log_{10} copies/mL blood) from baseline**

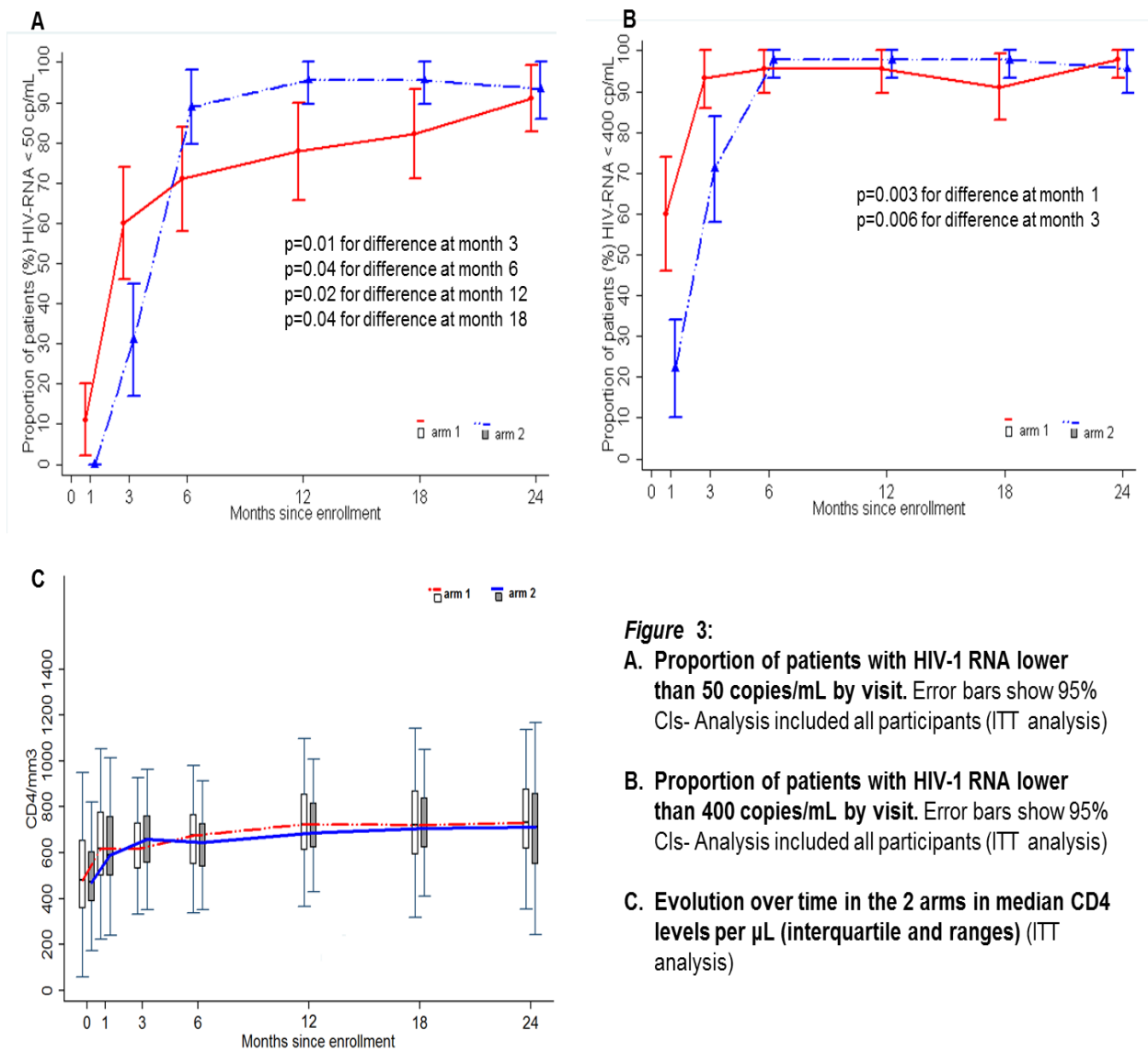


Figure 3:

A. Proportion of patients with HIV-1 RNA lower than 50 copies/mL by visit. Error bars show 95% CIs- Analysis included all participants (ITT analysis)

B. Proportion of patients with HIV-1 RNA lower than 400 copies/mL by visit. Error bars show 95% CIs- Analysis included all participants (ITT analysis)

C. Evolution over time in the 2 arms in median CD4 levels per µL (interquartile and ranges) (ITT analysis)

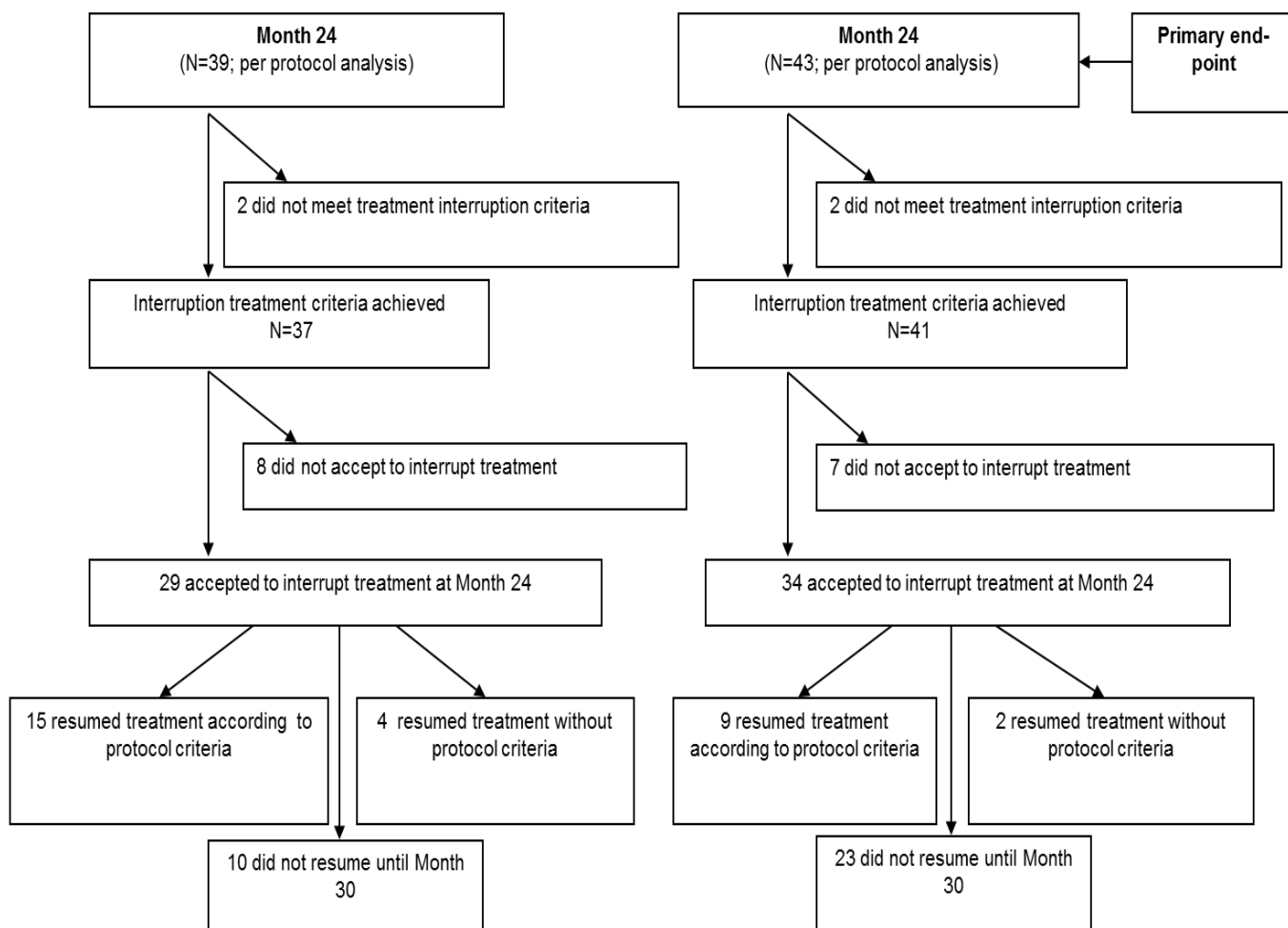


Figure 4 : Trial profile post-treatment interruption

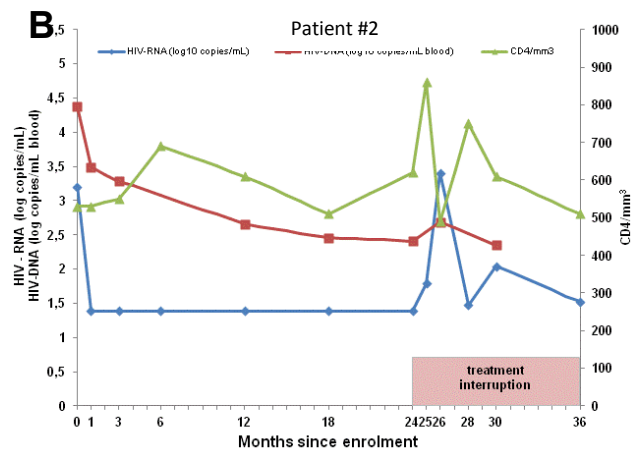
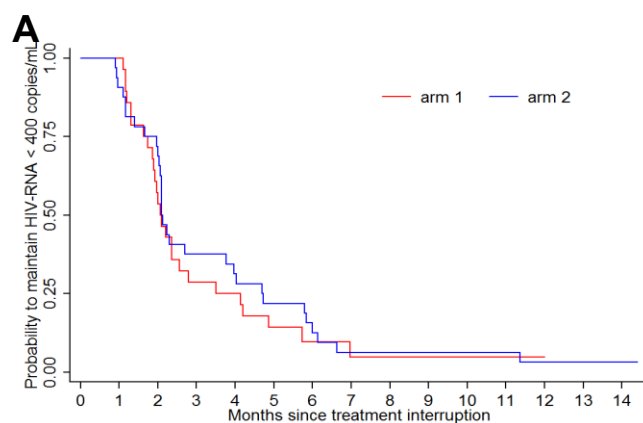
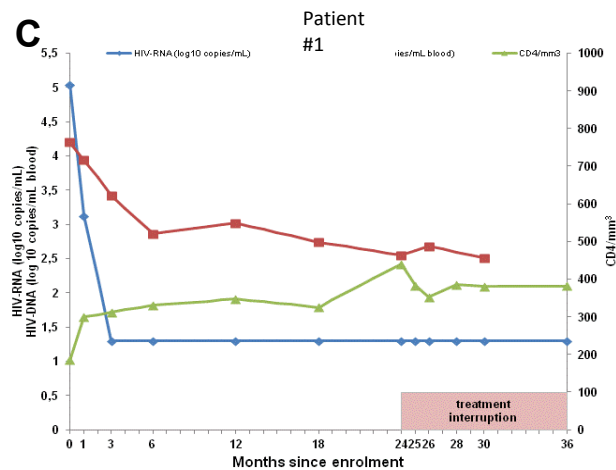


Figure 5 :

A. Probability to maintain HIV RNA <400 copies/ml after treatment interruption.

B et C. Immuno-virological parameter evolution of the patient #1 and #2.



Panel: Research in context

Systematic Review

HIV reservoirs are the main obstacle to HIV eradication. As these reservoirs are established early after infection, cART initiation during primary HIV infection (PHI) is now recommended in several guidelines.

We conducted a systematic search to address a clearly defined question: has the impact of intensive HAART started during early PHI on HIV blood reservoirs already been evaluated? We searched PubMed for articles published in English up to February 2014, using the terms maraviroc, raltegravir, reservoir, acute and primary HIV infection. Three articles were retrieved and hand-searched.

All these studies had a different design from our. The first one was a non randomised trial that included 15 patients presenting with acute PHI, in which cART (tenofovir/emtricitabine/efavirenz/raltegravir/maraviroc) had a greater impact on HIV-DNA levels than the same treatment started during the chronic phase of infection. The second study involved not acutely infected but recently infected patients (<6 months) who were randomised to raltegravir/tenofovir/emtricitabine (n=15) or to the same regimen intensified with maraviroc (n=15) for 48 weeks. Results were not significant and maraviroc had no added effect on HIV-DNA decrease. The third trial was randomised and enrolled 34 patient at PHI who received raltégravir, maraviroc plus protease inhibitor and nucleoside inhibitor *versus* protease inhibitor and nucleoside inhibitor. Interestingly there was a trend with a residual in the HIV-RNA kinetic in the pentatherapy arm. However, maybe due to small sample size and rate of retention, results were not conclusive

Interpretation

In a randomised trial we included 90 patients presenting PHI (median 35 days following infection) with 42 % in acute phase. Our study, the largest reported to date, failed to demonstrate any difference between the two treatments in HIV-DNA levels at month 24. HIV-DNA declined markedly and similarly in both arms; more than 90% of patients had HIV-RNA <50 copies/ml at M24. The pentatherapy was particularly effective on the HIV-RNA level for the first three months, but a significant proportion of patients had low but persistent viral replication until M18. This paradoxical result that might be due to the transient effect of maraviroc on immune cell trafficking through CCR5 blockade confirms the tendency in the previously cited trial. We also showed, for the first time in the context of a randomised trial, that a standardized interruption of an early cART can lead to a VISCONTI status. The continuous decrease of HIV-DNA until M24 indicates that more than two years treatment at PHI would increase the cART impact of HIV- in PHI treated patients.

Article IV

Early HAART in Primary HIV Infection protect T CD4 central memory cells and can induce HIV remission.

Chéret A, , G. Nembot, A. Mélard, C. Lascoux, C. Lécuroux, L. Slama, P. Miaillhes, P. Yeni, B. Hoen, I. Ravaux⁷, V. Avettand-Fenoel, C. Goujard, A. Venet, ML. Chaix, C. Tamalet, JM. Molina, C. Katlama, F. Raffi, J. Reynes, A. Lafeuillade, S. Abel, JF. Delfraissy, L. Meyer, C. Rouzioux for the OPTIPRIM ANRS Study Group

Manuscrit soumis pour publication au journal *PLOS Pathogens*

Poster présenté à la *CROI March 2014, Boston Abstract #590*

Communication orale, JNI 2014 Bordeaux, N°535

Objectifs

L'objectif de ce travail, réalisé en coopération avec l'équipe d'Immunologie du Professeur Brigitte Autran à l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière (INSERM UMR-S945) était d'évaluer l'impact des traitements initiés en primo-infection sur les réservoirs lymphocytaires sanguins et rectaux. Nous avons poursuivi la première étude effectuée à J0 (article 1) pour analyser chez les mêmes 11 patients, l'impact d'un traitement précoce de deux ans, sur la diversité virale dans les sous-populations lymphocytaires T CD4 circulantes, sur le niveau d'infection des lymphocytes T CD4 et des cellules de biopsies rectales, puis son impact sur l'homéostasie lymphocytaire. Cela nous a permis de décrire la fréquence d'infection dans les T CD4 et dans les sous-populations lymphocytaires en comparaison avec celle de patients traités en primo-infection en médiane 6 ans et celle de patients PTC. 10/11 patients ont arrêté le traitement après deux ans comme proposé dans le protocole, dans le but d'évaluer le niveau de contrôle immuno-virologique post-arrêt.

Principaux résultats

Nous montrons que le traitement précoce permet le maintien d'une diversité génétique restreinte du virus, quasi-identique à celle observée au moment de la primo-infection. La fréquence d'infection diminue dans les sous-populations mémoires T CD4 mémoires, centrales (TCM), transitionnelles (TTM) et effectrices (TEM) ($p < 0,002$) et de façon moindre dans les lymphocytes T CD4 naïfs (TN), cependant elle reste relativement élevée. Après deux ans de traitement, la reconstitution immunitaire permet une augmentation significative de toutes les sous-populations lymphocytaires. Les plus différenciées TTM et TEM présentent une contribution majeure au réservoir viral. Les niveaux et les fréquences d'infection dans les différentes sous-populations lymphocytaires sont équivalents chez les patients traités 6 ans et chez les PTC, alors qu'ils sont significativement plus élevés chez les patients traités 2 ans. Enfin dans les trois groupes, les TCM et TN contribuent significativement moins au réservoir que les TTM. Enfin, les réservoirs des sous-populations lymphocytaires sont réactivables *ex-vivo*.

Nous observons une diminution significative dans toutes les sous-populations lymphocytaires CD4 du marqueur Ki67. Par ailleurs, les fractions à J0 de cellules Ki67 + CD69 + CD25 + et DR + étaient plus élevées dans les TEM, mais pas dans les autres sous-populations. Au total, ces résultats suggèrent qu'à J0 que les TEM qui présentent le phénotype CD69 + CD25 + HLA-DR + Ki67- sont éliminées sans doute suite à la production du VIH et de ses effets

cytopathogènes (figure 3 A, 3B) minorant la contribution des cellules CD4 activées observée à JO. Enfin l'étude du réservoir à M24 du patient PTC montre un niveau d'infection particulièrement faible des TCM et des TN.

Discussion

Ce travail montre l'impact significatif d'un traitement initié dans les phases précoces de la primo-infection sur le réservoir, sur sa taille dans le sang et le rectum et sur sa distribution. Par ailleurs, la restriction de la diversité virale sous traitement dans les compartiments étudiés, met en avant la capacité du traitement à moduler l'évolution génétique du virus comme cela a été montré dans le GALT [435]

Un traitement de deux ans n'est pas suffisant pour tous les patients pour atteindre les niveaux d'infection et de contribution faible des TCM et des TN retrouvés chez les PTC ou les patients traités en médiane 6 ans. L'impact de deux ans de traitement sur le niveau d'infection et de contribution des TN est plus faible que sur les autres sous-populations à demi-vie longue, cela pouvant s'expliquer par leur longue demi-vie et leur faible nombre au moment de la primo-infection et un temps de traitement insuffisant. De plus un traitement de 6 ans permet une réduction du réservoir à des niveaux bas et similaires à ceux des PTC.

Au total, nous démontrons dans notre étude l'intérêt de traiter précocement en primo-infection et plus de deux ans ce que ne permet pas un traitement initié en phase chronique [245], pour atteindre chez un plus grand nombre de patient des niveaux de réservoir aussi bas que ceux associés à la rémission fonctionnelle au long cours en particulier en protégeant les cellules à vie longue TN et TCM. Le traitement précoce induit donc la protection des cellules T CD4 naïves et mémoires centrales de l'infection et modifie non seulement la quantité mais aussi la qualité des réservoirs.

Early cART in primary HIV infection protects CD4 central memory T cells and can induce remission

Antoine Chéret^{1,2*}, Charline Bacchus-Souffan^{3*}, Veronique Avettand-Fenoël^{1,2}, Adeline Mélard^{1,2}, Georges Nembot⁴, Catherine Blanc⁵, Assia Samri³, Asier Saëz-Cirion⁶, Laurent Hocqueloux⁷, Caroline Lascoux-Combe⁸, Clotilde Allavena⁹, Cécile Goujard¹⁰, Marc Antoine Valantin¹¹, Anne Leplatois¹², Laurence Meyer⁴, Christine Rouzioux^{1,2*}, Brigitte Autran^{3*} for the **OPTIPRIM ANRS 147 Study Group**.

1. EA 3620 Paris-Descartes University, Sorbonne Paris-Cité, Virology Laboratory, Necker Enfants-Malades Hospital, Paris. 2. Infectious Diseases Department, Dron Hospital, Tourcoing. 3. Pierre & Marie Curie University Paris VI, INSERM UMR-S 945 Immunity & Infection, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris. 4. Epidemiology and Public Health Department, Inserm U1018, Le Kremlin-Bicêtre, Univ Paris Sud, APHP. 5. CyPS Flow Cytometry Platform, Pierre & Marie Curie University, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris. 6. Institut Pasteur, Unity of regulation of retroviral infection, Paris, France. 7. Infectious Diseases Department, Hospital de la Source, Orléans. 8. Infectious Diseases Department, AP-HP, Saint-Louis Hospital, Paris. 9. Infectious Diseases Department, Hôtel-Dieu Hospital, Nantes. 10. Internal Medicine and Infectious Diseases Department, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre. 11. Infectious Diseases Department, AP-HP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris. 12. Infectious Disease Unit, L'archet Hospital, Nice, France.

* The first two authors and the last two authors contributed equally to the study.

Abstract

Post treatment controller status (PTC) has been associated with a low HIV reservoir, particularly in central memory CD4⁺T cells. We explored the subsets reservoir after 2 years of -cART initiated early at the time of primary HIV infection in 11 randomized patients (PHI2) (OPTIPRIM-ANRS147 trial). Blood resting CD4⁺T cells were sorted as naive (TN), central memory (TCM), transitional memory (TTM) and effector memory cells (TEM), and tested for total HIV-DNA quantification by ultrasensitive real-time PCR. Phylogenetic analysis of the viral quasi-species was performed using a limiting dilution approach. Viral inducibility was measured after culture of CD4⁺T cell subsets and activation with anti-CD3/anti-CD28/IL-2/IL-7 at M24. At M24, HIV-DNA levels in CD4⁺T cell subsets were compared with the ones previously obtained for 9 patients treated at PHI for a median of six years (PHI6) and for 11 (PTC).

From day 0 to M24, CD4⁺ T cell subset numbers largely increased ($p < 0.004$) and HIV-DNA level decreased in both of them and in PBMCs ($p < 0.004$). There was no change in viral diversity and viral production was induced in all CD4⁺T cell subsets. At M24, TN and TCM were less infected and less contributed to the reservoir than TTM and TEM ($p < 0.019$). Despite a significant decrease in HIV-DNA levels in all CD4⁺T cell subsets, the PHI2 ones were higher than those of both PHI6 and PTC ($p < 0.019$). Moreover, HIV-DNA levels of PHI6 were similar to those of PTC. One PHI2 reached a PTC status with HIV-RNA < 50 cp/mL 18 months after treatment interruption, with a very low HIV-DNA level in all CD4⁺T cell subsets similar to those in PTC.

Those results demonstrate the importance **of early and prolonged therapy** to reduce and tailor the CD4⁺ T cell HIV reservoirs by protecting long-lived TCM to increase the chances of inducing PTC.

Introduction

HIV eradication is hindered by the persistence of a latent viral reservoir that is constituted very early after infection and is widely distributed among CD4⁺ T cell types and compartments [1]. Primary HIV-1 infection (PHI) is characterized by exponential viral replication resulting in intense immune activation and a “storm” of inflammatory proteins [2], the level of which is correlated to disease progression [3]. Studies of HIV in untreated patients at different stages of infection have shown that HIV-DNA levels are particularly high at the time of acute infection [4]. HIV primarily targets the highly heterogeneous CD4⁺ T cell compartment that is massively depleted following infection [5,6], especially in gut-associated lymphoid tissues (GALT) [5,7], establishing both HIV reservoirs and a progressive immune deficiency [8,9].

Combined Antiretroviral Therapy (cART) initiation during PHI is nowadays recommended in multiple guidelines [10,11,12]. Early treatment suppresses viral replication, limits mucosal infection [13], protects the central nervous system [14], and prevents rapid progression to AIDS [15]. It has been also shown to help in preserving immunological status [16,17], with enhanced recovery of CD4⁺ T cell numbers and functions [18,19] and limited cell-associated HIV DNA levels [19,20,21]. Moreover, we have already shown that HIV-DNA decrease is more important in early-treated patients at the time of the primary-infection in comparison to those treated in the chronic phase [19]. The size of the HIV reservoir strongly correlates with the timing of initiation of cART [22], and cART initiation during PHI can prevent genetic evolution of HIV-1 in blood and GALT [23]. Our group has recently shown that early long-term antiretroviral treatment can favor HIV remission, also called functional cure. Indeed, HIV reservoirs in so-called Post-Treatment Controllers (PTCs) present a particularly low level of HIV-DNA in PBMC [24,25].

We studied 11 patients enrolled during early PHI (median 36 days post-infection) in the OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial comparing cART pentatherapy (including maraviroc and raltegravir) with classical tritherapy. Here, we analyze the impact of both early cART and its interruption after 24 months on the frequency of CD4⁺ T cell subsets infection, viral diversity, and CD4⁺ T cell homeostasis. We also examine the effect of early treatment and its duration on the size and distribution of the HIV reservoir by comparing the ones of these patients to those of another group of patients who started treatment early in the course of infection but who remained on therapy for a longer period (6 years), and also to those of PTCs.

Author summary

Post treatment controller status (PTC) has been associated with a low HIV reservoir, particularly in central memory CD4⁺T cell. As reservoirs are established early after infection, early antiretroviral therapy (early cART) at the time of primary HIV infection (PHI) has been suggested as one of the strategies allowing a better control over those and could lead to PTC. We studied in 11 patients, the impact of an early cART which was interrupted after 24 months, on the HIV reservoir in the CD4⁺ T-cell subsets. We compared the reservoir after 2 versus 6 years of early-cART to the low one found in PTC. We show that 2 years of early-cART reduces significantly the reservoirs within CD4⁺ T-cell subsets and protect the naïve and central memory T cell subsets. Despite this significant reservoir decrease, 6 but not 2 years of early-cART result in the low reservoir size found in PTC. One of the eleven patients is able to control the viremia 18 months after stopping treatment and present a weak reservoir. Those results demonstrate the importance of early and prolonged therapy to reduce and tailor the CD4⁺ T cell HIV reservoirs by protecting long-lived TCM to increase the chances of inducing PTC.

Results

Patient characteristics

Twelve patients recruited in the OPTIPRIM trial were enrolled in this HIV reservoir substudy. One subject stopped the treatment study after 17 months because of a pregnancy and was excluded from the analysis. They had the following characteristics: diagnosis at a median of 36 days after infection, symptomatic PHI, and fewer than 3 antibodies on HIV-1 Western blot for most of them, classifying them as a Fiebig stage III and V. They had a median of 376 CD4⁺ T cells/mm³ [IQR: 341; 516], 5.4 log HIV RNA copy number/mL plasma [5.0; 5.8] and 3.9 log HIV DNA copy number/10⁶ PBMC [3.48; 4.30] (table 1). All 12 patients started treatment immediately after diagnosis and was sustained for 2 years (2-year group), with a cART regimen consisting of raltegravir, maraviroc, darunavir/r and emtricitabine/tenofovir (arm 1, six patients) or darunavir/r and emtricitabine/tenofovir (arm 2, six patients). Treatment was interrupted at month 24 in the remaining 11 patients, who were then followed-up until month 30. Their main characteristics after 24 months of early-treatment were compared to those of two other groups of precociously-treated patients: ten patients studied after 6 years of early and continuous treatment, and eleven PTCs from the VISCONTI cohort who controlled their infection for a median of 8 years after early-treatment interruption [24]. CD4⁺ T cell counts, plasma HIV RNA levels and cell-associated HIV DNA loads in those three groups of patients are presented in table 2. All groups were analyzed with the same methodologies in the same laboratories.

Two years of early cART reduces the central memory CD4⁺ T cell reservoir to the low levels found in naive CD4⁺ T cells.

The distribution of the HIV reservoir was first studied in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the 11 subjects in the 2-year group by comparison with values at baseline [26]. Total cell-associated HIV DNA was quantified in PBMC as well as in sorted total, activated (CD25⁺ CD69⁺ HLA-DR⁺) and resting (CD25⁻ CD69⁻ HLA-DR⁻) CD4⁺ T cells, and in the four major resting CD4⁺ T cell subsets, namely TN, TCM, TTM and TEM (supplementary figure 1). HIV DNA was detected in PBMC and in all CD4⁺ T cell subpopulations after 2 years of early cART. Values at month 24 were significantly lower than baseline values in all cell populations ($p=0.001$), but the decrease was far more pronounced in TCM (-1.45 log cp/10⁶PBMC), TTM (-1.48) and TEM (-1.37) than in TN (-0.74) ($p<0.01$) (figure 1 and supplementary figure 2). Overall, the HIV reservoir decay between D0 and M24 was similar in activated and resting CD4⁺ T cells.

After two years of early cART, the frequency of infection in the TCM subset did not differ from that in the naive subset, contrasting with the differences observed at D0. Altogether, the less differentiated TN and TCM subsets displayed a significantly lower frequency of infection than the more differentiated TTM and TEM subsets at M24 ($p < 0.009$), whereas the frequency of infection was equivalently high in all three memory subsets at baseline (figure 1). Interestingly, these differences persisted when results were expressed as HIV DNA copy number/mL of whole blood for each CD4⁺ T cell subset (supplementary figure 3A). Of note, the decay in the frequency of infection of all subsets was similar in the two treatment arms and also similar to that reported for the 90 patients included in the OPTIPRIM clinical trial, demonstrating that pentatherapy had no additional efficacy over tritherapy on the reservoir decay [27] (supplementary figure 3B). Considering that a CD4⁺ T cell generally contains only one HIV-DNA copy [28], we estimated that about 0.09% of TN cells, 0.10% of TCM cells, and up to 0.20% of all memory cells remained infected at M24, contrasting with the 0.30% of TN and 3.49% of TCM infected cells at baseline. Proviruses in each resting CD4⁺ T cell subset remained fully inducible upon *in vitro* stimulation at month 24 (supplementary figure 4).

We were able to compare these peripheral blood reservoirs after 2 years of early cART with those present in rectal cells (RC) obtained from 3 patients at day 0 and from 14 patients at month 24 included in the OPTIPRIM trial. Total HIV DNA was quantified in total rectal cells and in sorted rectal CD3⁺CD4⁺ T cells. HIV-DNA levels decreased in peripheral CD4⁺ T cells and CD4⁺ rectal cells, in rectal cells and PBMC which presented the same frequency of infection at month M24 (supplementary figure S5).

The resting TTM subset represents the principal HIV reservoir after 2 years of early treatment.

Two years of cART initiated early after infection resulted in immune restoration, with a significant increase in both TN and TCM CD4⁺ T cell frequencies contrasting with a decay in both the TTM and TEM cell percentages. However, their proportions remained abnormal in comparison to the ones of healthy individuals, except for the TCM subset (supplementary figure 6). Of note, the absolute count of all subsets in blood increased in comparison to baseline values ($p < 0.004$, data not shown).

Interestingly, the expression of the three extracellular activation markers CD69, CD25 and HLA-DR on all subsets reached normal values at M24, decreasing solely in the long-lived TN and TCM subsets and increasing significantly in the short-lived TTM and TEM subsets. In contrast, the intracellular Ki67

expression diminished significantly in all CD4⁺ T cell subsets and returned to normal values at M24. Also, the proportion of Ki67⁺ cells was higher than the one of CD69⁺ CD25⁺ and HLA-DR⁺ cells among TEM cells at D0; and a similar trend was observed in TTM cells but not in the long-lived subsets (figures 2A 2B). Altogether, these results suggest that early cART protected the remaining CD69⁺CD25⁺HLA-DR⁺ Ki67⁺ cell fraction after probably elimination during the first week of infection due to active HIV replication and viral cytopathogenic effects.

We then estimated the contribution of each resting cell subset to the total HIV reservoir in peripheral blood CD4⁺ T cells, taking into account the frequency and infection level of each subset (figure 3). This analysis showed only a very minor contribution of activated CD4⁺ T cells to the circulating HIV reservoir after 2 years of treatment. Among the resting CD4⁺ T cell subsets, the main contributor to the reservoir was the TTM subset ($p < 0.019$), as already observed at baseline. The long-lived TCM subset contributed less to the reservoir than TTM cells, although its contribution at M24 was higher than at baseline, reflecting the reconstitution of the TCM subset after early-treatment. The only difference between D0 and M24 was an increase in the contribution of the TN subset to the reservoir load, from a median of 2% at D0 to 17% at M24 ($p = 0.001$), presumably due at least in part to the low relative decline in their frequency of infection rather than to the increase in their peripheral cell count.

Early cART limits viral diversity.

Viral diversity at month 24 was compared to the one at baseline after sequencing HIV DNA and HIV RNA in the *ENV* C2V5 region of the *gp120* gene in 6 of the 11 patients for whom sufficient cell numbers were available (figure 4). Cloning by the limiting dilution approach was not possible in some subsets because of insufficient yields. Viral tropism was CCR5-restricted for all 800 isolated clones and did not change between D0 and M24. The topography of phylogenetic trees showed that the viral quasi-species in plasma, PBMC, purified peripheral CD4⁺ T cell subsets, total rectal cells and purified CD4⁺ rectal cells all belonged to the same viral cluster in a given subject. The limited quasi-species diversity observed in the acute phase of infection was maintained over the 2 years of early cART. In one patient (subject #7), the same low diversity was observed at day 0 and M24. We could identify 3 genetic mutations differentiating a cluster exclusively found in plasma at day 0 from another cluster found in total activated CD4⁺ T cells, resting TCM and TTM CD4⁺ T cell subsets as well as in plasma. The first was the silent C331C mutation and the other

two were encoding mutations. The viral cluster localized exclusively in the plasmatic compartment at D0 was later founded in TN, TCD4 activated, TTM, rectal cells biopsies at month 24, and contained the R335G and N355K encoding mutations. The other cluster isolated from TCD4 subsets at D0 and 24 and from plasma at D0 contained an encoding mutation the R335R and N355E.

Early cART can induce HIV remission.

Ten of the eleven patients discontinued treatment at M24, as required by the protocol of the OPTIPRIM trial. Plasma HIV RNA levels rose above 400 copies/mL in eight subjects, four of whom resumed treatment before M30. Interestingly, two patients (#4 and #8) still had viral loads below 400 copies at M30 without taking any treatment. Neither of them carried the protective HLA class I alleles (table 1). Patient #4 had received tritherapy (treatment arm 2) and patient #8 got pentatherapy (treatment arm 1). Patient #4 displayed the HLA-B*35 allele, and had a high viral load (5.04 Log) and a severe CD4⁺ T cell depletion (185/mm³) upon treatment initiation. Plasma HIV RNA declined rapidly between D0 and M3, and then remained below 20 copies/mL at all-time points, even one year after treatment interruption. Patient #8 displayed the HLA-B*08 allele and had a milder primary infection than patient #4 (3.2 Log HIV RNA copies/mL and 530 CD4⁺ T cells/mm³). His viral load was rapidly controlled by treatment (<20 copies/mL at M1). A transient loss of viral control was observed 2 months after treatment interruption (3.4 Log HIV RNA copies/mL), but spontaneous control was regained after 6 months off therapy. This patient's viral load was at 2.72 Log HIV-RNA copies/mL (530 copies/mL) at 18 months while still off therapy.

The decline in HIV DNA from baseline to M24 was -1.64 and -1.96 log copies/mL of whole blood in patients #4 and #8 respectively, and did not differ much from that observed in the other patients whatever the treatment arm (table 1 and supplementary figure 3A). However, their HIV DNA levels were among the lowest observed at month 24, particularly in naive and central memory CD4⁺ T cells (Figure 6A). In addition, autologous viral replication was detected for both patients after activation of sorted CD4⁺ T cell subsets in cell culture at treatment interruption (M24) and at M30, confirming that both of them carried replication-competent viruses (figure 5).

We also investigated the CD8⁺ T cell responses specific to HIV, which are thought to play an important role in the natural control of infection [29]. Those responses were weak in all 11 patients studied. Moreover, the CD8⁺ T cells from patients #4 and #8 were unable to suppress HIV-1 infection in autologous CD4⁺ T cells at D0, M24 and M30 (data not shown).

Prolonged early treatment of 6 years drives the HIV reservoir down to levels close to those of Post-Treatment Controllers.

We lastly compared the reservoir size and distribution of patients treated early and for 2 years to those observed after a more prolonged early treatment (median 6 years), as well as those of the previously described PTCs [24].

In all subsets, the frequency of infection, expressed as HIV DNA log copies/mL of whole blood and as, HIV DNA log copies/million PBMC (not shown), was significantly higher in the 2-year group than in both the 6-year group and the PTCs ($p < 0.019$) (figure 6A). In contrast, all naive and memory CD4⁺ T cell subsets in the 6-year group contained low levels of HIV DNA similar to those of PTCs. Interestingly, HIV DNA was detected in 4/9 sorted-TN samples from the 6-year group, contrasting with the 11/11 two-year samples and the only 2/11 PTC samples (figure 6A).

The contribution of each subset to the HIV reservoir displayed the same pattern in the three groups (figure 6B). The main signature was a low contribution of the TCM subset in all groups, to the benefit of a predominant contribution of the TTM subset ($p < 0.027$). The only noteworthy difference among the three groups was a low frequency but a far stronger contribution of the TN subset in the 2-year group than in the PTCs ($p = 0.010$).

Discussion

This study demonstrates the major impact of early and prolonged suppressive antiretroviral therapy on the size and distribution of the HIV reservoir amongst the major CD4⁺ T cell subsets. Indeed, two years of early cART protected the long-lived CD4⁺ T cells from infection although the reservoir size did not reach the low levels characteristic of Post-Treatment Controllers, but a degree of control was achieved after treatment interruption nonetheless.

Initiation of cART within one month after infection resulted, after two years of continuous and virologically effective treatment, in a massive decrease in the HIV reservoir size among the major CD4⁺ T cell subsets in blood and rectal biopsy specimens, in accordance with previous studies [21]. In addition, early treatment modified the HIV reservoir distribution with a relative protection of memory CD4⁺ T cells, possibly reflecting differences in the homeostasis of these various cell subsets. Indeed, the weaker reservoir decay observed in the resting TN subset than in the three memory subsets suggests that 2 years of cART is too short to reduce the infection level in TN cells, which display a half-life of up to several years that contrasts with the one of a few weeks to months in the memory subsets. The immune reconstitution achieved after two years of early treatment could have favored the replenishment of uninfected TCM cells, thereby reducing the infection level of TCM to that of their naive counterparts. This was not the case for TTM or TEM cells though, the proportions of which decreased with the control of viral replication. Finally, two years of early cART also reduced the immune activation to normal levels in all CD4⁺ T cell subsets. A very interesting discrepancy was observed in the activation marker expression by TCM, TTM and TEM. Indeed, the expression of Ki67, an early activation marker linked to cell cycling, displayed an increasing gradient along T cell differentiation, from TN to TCM, TTM and TEM cells, returning to normal values after 2 years of treatment as expected. Unexpectedly, baseline levels of the CD69, CD25 and HLA-DR markers linked to T cell activation and type I interferons did not differ on TTM and TEM cells from the one of TCM cells, and were even lower than the Ki67 ones. This suggests that, at baseline, most activated TEM cells (and, to a lesser degree, TTM cells) expressing CD25, CD69 and HLA-DR had been already eliminated due to their active viral production, while cells displaying Ki67 but not the other activation markers persisted as they may have not been engaged in viral production yet. Two years of effective antiretroviral treatment allowed CD25⁺ CD69⁺ HLA-DR⁺ TEM and TTM cells to return to normal values and Ki67⁺ TEM and TTM cells to decrease to normal frequencies.

This 2-year course of early cART did not reduce the size of the HIV reservoirs in the same extent as a 6-year course, which reduced them to levels observed in PTCs, particularly in the long-lived TCM subset [30]. This challenges a previous report suggesting that the extent of cellular HIV DNA correlates with the timing of cART initiation but not with its duration [31]. However, this latter study involved 55 chronically-treated patients but only 6 acutely-treated patients. This early 2-year cART regimen allowed post-treatment control of the virus in one patient over 6 months (subject #4) who might be assimilated to a PTC, and partial control in a second one (subject #8). Of note, HIV DNA levels in these two patients' TCM cells were comparable to those observed in the PTCs (VISCONTI patients). In accordance with previous reports of treatment discontinuation after initiation during primary infection [32,33,34,35,36], our findings suggest that the smaller the HIV reservoir, the better the post-treatment viral control. Therefore, rapid obtention of a very low reservoir levels might be a condition for long-term remission as in PTCs. However the decrease of the HIV-DNA in the two PTC was not different from the other patients, showing that HIV-DNA decrease within two years do not help to characterize PTC status. Moreover, the genetic viral evolution was also not different.

We used total HIV DNA to quantify the persistent reservoir, as it was shown to correlate well with the level of integrated HIV DNA [37]. We confirmed that cell-associated HIV was fully inducible upon *in vitro* stimulation, confirming that at least a proportion of viruses were replication-competent virus stored in long-lived resting cell compartments [38], however due to lower amount of blood and small T cell subsets fractions, it was not possible to estimate the proportion of infectious and defective virus with a quantitative approach as it has been recently reported by Ho & al on resting CD4 T cells [39] was. Finally, the maintenance of the same limited viral diversity before and after early cART underlines the importance of the timing of initiation of cART on the viral reservoir genetic diversity. Adding to the observation of the same frequency of infected cells in blood and gut, we demonstrate here that this phenomenon is observed in patients treated in acute infection and is in accordance with previous studies in virally-suppressed chronic patients [40,41]. Also, this finding and the observation of the same viral cluster in both compartments suggest a cross-infection between blood and gut, and a predominance of CD4+ T cells as the major reservoir for HIV over different phases of the infection [42].

In conclusion, these results demonstrate the importance of early and prolonged therapy to reduce and tailor the CD4+ T cell HIV reservoirs by protecting long-lived TCM cells. Two years of early therapy reduced persistent HIV reservoirs but was not sufficient to reach the low reservoir size found in Post-Treatment Controllers, contrarily to a 6-year regimen. These findings provide new information in the search for an HIV cure, outlining the importance of both early and sustained antiretroviral therapy in the objective of reaching a sustainable remission. Longer treatment times would probably increase the chances of inducing a control of the infection after therapy interruption as seen in PTCs.

Methods

Ethics Statement

After written informed consent, peripheral blood and rectal biopsies were collected from HIV-1-infected adults (18 years or older) in research centers participating in the OPTIPRIM ANRS-147 clinical trial (ID RCB: 2009-014742-28), and the VISCONTI ANRS EP47 study. The studies were reviewed and approved by the French Health Products Safety Agency (AFSSAPS). Human experimentation guidelines of the declaration of Helsinki, the French Public Health Code and the Guidelines for Good Clinical Practice from the French Department of Health were followed in the conduct of those research programs.

Patient characteristics

HIV-1-infected subjects were included in the randomized ANRS-147 OPTIPRIM and PRIMO-cohort cohort after signed informed written consent. The first 12 patients from the ANRS-147 OPTIPRIM clinical trial who accepted to participate to this substudy, were included (6 per arm). They were immediately treated with either a classical 3-drug regimen [tenofovir/emtricitabine (TVD), darunavir/ritonavir 800/100 (PRZ) once daily, arm 2] or an intensified 5-drug regimen [TVD, PRZ add to raltegravir (RAL) 400 mg twice daily and maraviroc (MVC) 600 mg twice daily, arm1] with an interruption of treatment at month 24 after therapy initiation. Early PHI was defined by a positive ELISA assay with an incomplete western blot assay (Early PHI), by the presence of a negative or weakly positive ELISA assay, with a negative or less than 1 band Western Blot assay (acute PHI) performed within 8 days of inclusion and a positive HIV-RNA and/or p24 antigenemia (performed within 8 days of inclusion). To be enrolled in the trial, patients presented those biologic criteria and had either a symptomatic PHI, or in case of a pauci-symptomatic PHI, CD4+ T cell

count was under 500/mm³ plasma. The time from contamination was estimated by adding 15 days from the first symptoms or 30 days in the case of an incomplete Western Blot, or by the median date between the last negative and first positive serology), a positive plasma viral load, and with the presence of anti-p24 antibodies associated with anti-gp160, anti-gp120 or anti-gp41 antibodies. Blood samples were collected before and 2 years after treatment, and between the interruption of treatment at month 24 and month 30. Patients could stop taking their treatment if they presented an undetectable HIV-RNA load < 50 copies/mL and more than 500 CD4⁺ T cells/mm³. Treatment was resumed when HIV RNA load was over than 50,000 copies/mL or if the CD4⁺ T cell count dropped under 500 cells/mm³ or below 30%. Subjects from the EP47 VISCONTI study were divided in two groups, both treated within 10 weeks from infection with a classical 3-drug regimen. The first group consisting of 10 subjects has been treated for a median of 79 months and never stopped taking treatment. The second group of 11 Post-Treatment Controllers has been presenting a control of the infection for a median of 101 months after interrupting a therapy maintained for 31 months, their data have been previously reported [24]. Both groups display a normal CD4⁺ T cell count and a controlled viral load at the time of our study.

CD4⁺ T cell differentiation analysis and sorting

PBMC cryopreserved and stored in liquid nitrogen, with more than 80% viability after thawing, were sorted as live activated and resting CD3⁺CD4⁺ T cells on a 5-laser FACS ARIA (Becton Dickinson) on the CyPS platform (UPMC) after staining with the following combination: Live-Dead Fixable Aqua (Life Technologies), CD3-Pacific Blue (UCHT1), CD4-AlexaFluor700 (RPA-T4), CCR7-PE Cyanine7 (3D12), CD27-APC (L128), CD69-FITC (L78) and HLA-DR-FITC (L243) from BD Pharmingen, CD45RA-ECD (2H4) and CD25-FITC (B1.49.9) from Beckman Coulter. Resting CD4⁺ T cells (CD25⁻CD69⁻HLADR⁻) were further sorted as: naive (TN, CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), central-memory (TCM, CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺), transitional-memory (TTM, CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺), and effector-memory cells (TEM, CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻) (supplementary figure S1). Of note, antigens expression on thawed cells was not significantly different than the one on fresh cells, and cell activation was also evaluated on fresh cells. The number of cells collected ranged from 0.01 to 2 million cells per subset and per subject, and the purity of sorted subsets was over 98%. Flowjo software (Treestar) was used to analyze the data.

Ultrasensitive total HIV-DNA and HIV-RNA Quantification

Total HIV-DNA was quantified by ultrasensitive real-time PCR in PBMC, activated or resting CD4 and CD4⁺ T cell subsets using the GENERIC HIV-DNA assay from Biocentric (Bandol, France), with a threshold of detection of 5 HIV-DNA copies per PCR as previously described [43]. Total DNA was extracted with a QIAamp All prep DNA/RNA microkit or minikit (Qiagen), depending on the number of cells available (< and > 1 million cells respectively). The entire HIV-DNA extract was tested in two to four replicates. Results were reported as either the actual number of HIV-DNA copies per million cells or as an estimated value calculated as 50% of the detection threshold value when HIV-DNA was not detected. The thresholds varied according to available cell numbers and were calculated for each sample. HIV-RNA was quantified in plasma by real-time RT-PCR with the Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 assay (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's recommendations. HIV-RNA was quantified in culture supernatants by ultrasensitive real-time PCR using the GENERIC HIV assay (Biocentric, Bandol, France). The extracts were tested in two to five replicates.

HIV Reactivation Assay

Variable numbers of sorted peripheral resting CD4⁺ TN, TCM, TTM and TEM subsets (from 0.05 to 2 million cells) were cultured in 10% FCS-supplemented RPMI 1640 medium for 13 days after stimulation at day 0 with anti-CD3/anti-CD28 +IL-2 (Roche, 5 µg/mL) +human recombinant IL-7 (R&D Systems, 1 ng/mL). At days 3, 6, 8 and 10, half of each supernatant was removed to quantify HIV-RNA, and IL-2 and IL-7 were added. HIV-RNA was also quantified at Day 13. Results are expressed as the ratio between the number of HIV-RNA copies in supernatants on each day of culture and the level of total HIV-DNA in the subset measured at Day 0 of culture.

Statistical Analysis

A two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare cell subsets, and Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests to compare the different groups of subjects. A *p* value lower than 0.05 was considered a significant difference. All values given in the text are medians and [IQR 25-75%].

HIV-DNA genotyping and phylogenetic analysis

We performed HIV-DNA sequencing and cloning in each CD4 T cells subsets at month 24 as previously described [44]. The phylogenetic tree included all clones obtained at day 0 and month 24 and were built with Kimura's two-parameter method [45],

Acknowledgments

We would like to thank the study participants involved in those studies, along with all clinicians for providing the patient samples, Thierry Allègre (Hospital Aix-en-Provence), Laurence Slama (Tenon Hospital, Paris), Yazdan Yazdanpanah (Dron Hospital, Tourcoing), Claudine Duvivier (Necker Hospital, Paris), Paul-Henry Consigny (Centre de consultation de l'Institut Pasteur, Paris), Patrick Yeni (Bichat Hospital, Paris), and Jacques Reynes (Gui de Chauliac Hospital, Montpellier). We also would like to acknowledge the scientific committees of the OPTIPRIM ANRS 147 and VISCONTI ANRS EP47 studies for its members' intellectual and conceptual contributions. We also wish to thank Ingrid Bénard, Céline Chaillot and Theodora Harambure for monitoring the data, Sandrine Couffin-Cadiergues and Juliette Saillard from the Clinical Research Department at ANRS, as well as the scientific comitee and David Young for editing the manuscript.

Figure Legends

Table 1: Characteristics of the HIV-1-infected subjects at baseline and month 24 in the 2-year treatment group.

Abbreviations: M, Man; CD4, CD4 T lymphocyte; CD8, CD8+ T lymphocyte; DNA, Deoxyribonucleic acid; HIV, Human immunodeficiency virus; HLA, Human leukocyte antigen; IQR, Interquartile range; Log₁₀, decimal Logarithm; W, Woman; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells; RNA, Ribonucleic acid; Δ, Delta.

Table 2: Characteristics of the HIV-1-infected study participants.

Statistical analyses were conducted strictly between the 2-year/M24, 6-year and PTC groups.

* The 6-year group was significantly different from both the 2-year and the PTC groups.

** The 2-year group was significantly different from both the 6-year and the PTC groups.

*** The 2-year group was significantly different from the 6-year group.

Abbreviations: 2-year/M24, early-cART for 2 years; 6-year, early-cART for 6 years; D0, untreated acute HIV-1 infection; PTC, Post-Treatment Controllers.

Figure 1: HIV-DNA load decrease after two years of early-cART.

The total HIV-DNA content was evaluated in various subsets of naive (TN), and central (TCM), transitional (TTM) and effector (TEM) memory CD4 T cell subsets. Measurements were conducted both in acute infection (D0, black symbols) and two years after an early-cART uptake (M24, red symbols). Only significant p-values are represented. Results are expressed as the log₁₀ HIV-DNA copies per million of PBMC and black lines represent the medians. The open symbols represent values below the threshold of detection.

Figure 2: Analysis of the immune CD4 T cell activation.

Immune activation was evaluated in total CD4 T cells (CD4 T Ly) and in various subsets of resting naive (TN) and central (TCM), transitional (TTM) and effector (TEM) memory CD4 T cells. Activation levels were determined by measuring either the expression of one of the three molecules CD25, CD69 and HLA-DR (**A**), or the expression of Ki67 (**B**). Results are expressed as the percentage of cells expressing these molecules, and were compared between HIV-infected patients in acute infection (D0), two years after an early-treatment (M24) and in uninfected individuals. Each symbol represents one individual and horizontal lines are medians. Black circle represent J0, red square M24, and grey triangle uninfected individuals.

Figure 3: CD4 T cell subsets contribution to the pool of infected cells.

The contribution of each cell subset to the HIV reservoir was estimated by taking into account the frequency and infection level of each subset. Results are expressed as the percentage of the HIV reservoir, for TN, TCM, TTM and TEM cells at D0 (black symbols) and M24 (red symbols). Each symbol represents a subject, and horizontal lines are medians.

Figure 4: Viral diversity of the HIV reservoir.

HIV-1 diversity was evaluated in the blood and the rectum both in acute infection and two years after early-cART. Each HIV-1 clone was compared to the sequence of reference FR-HXB2, figured on top of each maximum-likelihood tree as root. All clusters identified with the maximum-likelihood approach were confirmed with a neighbor-joining analysis. The numbers near the nodes indicate the percentage of bootstrap replicates (1,000).

The *ENV* gene was cloned from HIV-RNA in:

-Day 0: plasma (blue circle).

The *ENV* gene was cloned from HIV-DNA in:

-Day 0: resting CD4 cells (red down-triangle), activated CD4 cells (red open diamond), resting TN cells (red diamond), resting TCM cells (red square), resting TTM cells (red circle), resting TEM cells (red up-triangle), total rectal cells (blue square) and isolated-CD4 rectal cells (blue open square).

-Month 24: resting CD4 cells (black down-triangle), activated CD4 cells (black open diamond), resting TN cells (black diamond), resting TCM cells (black square), resting TTM cells (black circle), resting TEM cells (black up-triangle), total rectal cells (green square) .

Figure 5: Replication-competent viruses from patient number 4 and 8 are able to spread and infect heterologous cell cultures. Supernatants from PHA-activated CD4 T cells from patient #4 (blue) and #8 (red) at M30 obtained at days 7 to 13 of culture were pooled and used to infect in triplicate CD4 T cell blasts from an uninfected individual. Reference of the maximum values obtained after infection of the same cells with the BX08 (dashed lines) and 132W (dotted lines) viral isolates are figured on the plot. Viral replication was quantified by measuring p24 production in culture supernatants. Means and standard deviation are shown for each point.

Figure 6: Two years of early-cART are not sufficient to reach the low HIV reservoir of PTCs.

The reservoir size and composition was evaluated in various subsets of naive (TN), and central (TCM), transitional (TTM) and effector (TEM) memory CD4 T cell subsets. Measurements were conducted in early-treated subjects whose treatment was taken for two years (2-year, red circle), six years (6-year, black circle), and in the unique control of the infection after interruption of an early-cART, the Post-Treatment Controllers (PTC) (black triangle). Green circle represent PTC #4 and purple circle PTC #8 from the 2-year treatment group. **A.** Results are expressed as the log₁₀ HIV-DNA copies per mL of blood, and values below the threshold of detection were calculated for each assay according to the available cell numbers. **B.** The contribution of TN, TCM, TTM and TEM cells to the HIV reservoir was estimated by taking into account the frequency and infection level of each subset. Results are expressed as the percentage of the HIV reservoir, for the different groups of subjects 2-year (red symbols), 6-year (black symbols) and PTCs (white symbols). Each symbol represents a subject, and horizontal lines are medians. Values under the threshold were represented by an open symbol.

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary Figure S1: Cell sorting scheme.

Live resting CD3+CD4+ T cell subsets (CD25-, CD69- and HLA-DR-) were sorted by flow cytometry according to their differential expression of CD45RA, CCR7 and CD27, as naive (TN, CD45RA+CCR7+CD27+), central-memory (TCM, CD45RA-CCR7+CD27+), transitional-memory (TTM, CD45RA-CCR7-CD27+), and effector-memory cells (TEM, CD45RA-CCR7-CD27-).

Supplementary Figure S2: Impact of two years of early-cART on HIV-1 reservoirs.

The decrease of total HIV-DNA was calculated as the difference between HIV-DNA copies/million cells before and after a 2-year long early-cART. Each symbol represents a subject, and horizontal lines are medians. The decrease was calculated for PBMCs, either total (CD4 T Ly), activated (ACT+ CD4 T Ly) and resting (ACT- CD4 T Ly) CD4 T cells, and in the resting CD4 T cell subsets TN, TCM, TTM and TEM cells. Only significant *p*-values are represented.

Supplementary Figure S3: HIV-DNA load decrease after two years of early-cART.

A. Total HIV-DNA per mL of blood was quantified in TN, TCM, TTM and TEM cells at D0 (black symbols) and at M24 (red symbols). The open symbols represent values below the threshold of detection. Green circles represent PTC #4 and purple circle PTC #8. Only significant *p*-values are represented. **B.** The decrease of total HIV-DNA was calculated as the difference between HIV-DNA copies/million cells before and after a 2-year long early-cART in the pentatherapy arm1 and in the triple-drug arm 2. Each symbol represents a subject, and horizontal lines are medians. The decrease was calculated for PBMCs, either total (CD4 T Ly), activated (ACT+ CD4 T Ly) and resting (ACT- CD4 T Ly) CD4 T cells, and in the resting CD4 T cell subsets TN, TCM, TTM and TEM cells. Green circle represent PTC #4 and purple circle PTC #8.

Supplementary Figure S4: HIV reactivation assay.

Cell capacity to induce HIV replication from resting CD4 T cell subsets was evaluated by stimulating sorted CD4 T cell subsets with anti-CD3/anti-CD28 co-stimulation plus IL-2 plus IL-7. HIV-RNA was quantified in supernatants of resting TN, TCM, TTM and TEM cells during a 13-day long culture at D3, D6, D8, D10 and D13. Results are expressed as the log10 of the ratio between the number of HIV-RNA copies quantified on a given day of culture and the level of total HIV-DNA in the subset measured at D0 of culture. Each symbol represents a subject, and the number of reactivated samples is indicated relatively to the number of tested samples in each assay. Measurements were done in patients after two years of an early-cART regimen (2-year).

Supplementary Figure S5: HIV-DNA after two years of early-cART in sorted PBMC and rectal cells.

HIV DNA was measured in sorted total rectal cells and purified-CD4+T rectal cells, and measured in parallel in PBMC and CD4 T cells from periphery at month 24. Rectal cells (RC, red square), PBMC (red circle), circulating CD4 T cells (CD4, red up-triangle), and rectal CD4 T cells (red down-triangle) are depicted on the figure. Horizontal lines represent medians and open symbols represent values below the threshold of detection.

Supplementary Figure S6: CD4 T cell subsets repartition.

The repartition of resting CD4 T cell subsets was assessed in eleven acutely HIV-infected individuals at Day 0 (grey), at Month 24 (red), and in ten uninfected individuals (white). The analyzed resting CD4 subsets are: naive (TN, CD45RA+CCR7+CD27+), central-memory (TCM, CD45RA-CCR7+CD27+), transitional memory (TTM, CD45RA-

CCR7-CD27+) and effector-memory cells (TEM, CD45RA-CCR7-CD27-). Results are expressed as the percentage of resting CD4 T cells.

References

1. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, et al. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869-8873.
2. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF (2011) Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 364: 1943-1954.
3. Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, et al. (2010) Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 24: 819-831.
4. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, et al. (2006) CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42: 709-715.
5. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-1097.
6. Nishimura Y, Sadjadpour R, Mattapallil JJ, Igarashi T, Lee W, et al. (2009) High frequencies of resting CD4+ T cells containing integrated viral DNA are found in rhesus macaques during acute lentivirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8015-8020.
7. Kinloch-de Loes S, de Saussure P, Saurat JH, Stalder H, Hirschel B, et al. (1993) Symptomatic primary infection due to human immunodeficiency virus type 1: review of 31 cases. *Clin Infect Dis* 17: 59-65.
8. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, et al. (2004) T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *Journal of virology* 78: 1160-1168.
9. Mehandru S, Dandekar S (2008) Role of the gastrointestinal tract in establishing infection in primates and humans. *Current opinion in HIV and AIDS* 3: 22-27.
10. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH, recommandations du groupe d'experts sous la direction du Professeur P. Morlat. La documentation Française Paris : 2013 476 p http://www.santegouv.fr/IMG/pdf/Rapport_morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf (Consulté le 3 Mars 2014).
11. [Consensus Statement by GeSIDA/National AIDS Plan Secretariat on antiretroviral treatment in adults infected by the human immunodeficiency virus (Updated January 2013)]. *Enferm Infect Microbiol Clin* 31: 602 e601-602 e698.
12. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, et al. (2012) Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 308: 387-402.
13. Haase AT (2010) Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464: 217-223.
14. Sailasuta N, Ross W, Ananworanich J, Chalermchai T, Degruittola V, et al. (2012) Change in Brain Magnetic Resonance Spectroscopy after Treatment during Acute HIV Infection. *PLoS One* 7: e49272.
15. Berrey MM, Schacker T, Collier AC, Shea T, Brodie SJ, et al. (2001) Treatment of primary human immunodeficiency virus type 1 infection with potent antiretroviral therapy reduces frequency of rapid progression to AIDS. *J Infect Dis* 183: 1466-1475.
16. Fidler S, Porter K, Ewings F, Frater J, Ramjee G, et al. (2013) Short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *The New England journal of medicine* 368: 207-217.
17. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, et al. (2010) B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* 116: 5571-5579.

18. Le T, Wright EJ, Smith DM, He W, Catano G, et al. (2013) Enhanced CD4+ T-cell recovery with earlier HIV-1 antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine* 368: 218-230.
19. Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, et al. (2013) Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68: 1169-1178.
20. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, et al. (2007) Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *The Journal of infectious diseases* 195: 1762-1764.
21. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, de Souza M, et al. (2012) Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PloS one* 7: e33948.
22. Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, et al. (2011) Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC infectious diseases* 11: 146.
23. Evering TH, Mehandru S, Racz P, Tenner-Racz K, Poles MA, et al. (2012) Absence of HIV-1 Evolution in the Gut-Associated Lymphoid Tissue from Patients on Combination Antiviral Therapy Initiated during Primary Infection. *PLoS Pathog* 8: e1002506.
24. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, et al. (2013) Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS pathogens* 9: e1003211.
25. Hocqueloux L, Prazuck T, Avettand-Fenoel V, Lafeuillade A, Cardon B, et al. (2010) Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS* 24: 1598-1601.
26. Lecuroux C, Girault I, Boutboul F, Urrutia A, Goujard C, et al. (2009) Antiretroviral therapy initiation during primary HIV infection enhances both CD127 expression and the proliferative capacity of HIV-specific CD8+ T cells. *AIDS* 23: 1649-1658.
27. Chéret A, Bacchus C, Mélard A, Nembot G, Blanc C, et al. (2014) Early HAART in Primary HIV Infection protect TCD4 central memory cells and can induce HIV remission CROI 2014. BOSTON.
28. Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brannstrom J, Shao W, et al. (2011) Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11199-11204.
29. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, et al. (2007) HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6776-6781.
30. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, et al. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine* 15: 893-900.
31. Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, et al. (2011) Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infect Dis* 11: 146.
32. Steingrover R, Garcia EF, van Valkengoed IG, Bekker V, Bezemer D, et al. (2010) Transient lowering of the viral set point after temporary antiretroviral therapy of primary HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses* 26: 379-387.
33. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, et al. (2000) Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407: 523-526.
34. Kaufmann DE, Lichterfeld M, Altfeld M, Addo MM, Johnston MN, et al. (2004) Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS medicine* 1: e36.

35. Lampe FC, Porter K, Kaldor J, Law M, Kinloch-de Loes S, et al. (2007) Effect of transient antiretroviral treatment during acute HIV infection: comparison of the Quest trial results with CASCADE natural history study. *Antiviral therapy* 12: 189-193.
36. Hoen B, Fournier I, Lacabaratz C, Burgard M, Charreau I, et al. (2005) Structured treatment interruptions in primary HIV-1 infection: the ANRS 100 PRIMSTOP trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 40: 307-316.
37. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, et al. (2013) Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathogens* 9(2): e1003174. doi:10.1371/journal.ppat.1003174.
38. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53: 557-593.
39. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, et al. (2013) Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155: 540-551.
40. Descours B, Lambert-Niclot S, Mory B, Samri A, Charlotte F, et al. (2013) Direct quantification of cell-associated HIV DNA in isolated rectal and blood memory CD4 T cells revealed their similar and low infection levels in long-term treated HIV-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 62: 255-259.
41. Avettand-Fenoel V, Prazuck T, Hocqueloux L, Melard A, Michau C, et al. (2008) HIV-DNA in rectal cells is well correlated with HIV-DNA in blood in different groups of patients, including long-term non-progressors. *AIDS* 22: 1880-1882.
42. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, et al. (1998) Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427-431.
43. Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, et al. (2009) LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *Journal of medical virology* 81: 217-223.
44. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, et al. (1993) Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257-1261.
45. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111-120.

Table 1: Characteristics if the HIV-1 infected subjects at baseline and month 24 in the two year treatment group

Baseline												After 24 months of treatment				
Patients	Sex Age years	Symptomatic Primary HIV-1 Infection	Estimated days from contaminatio n	Number of anti-HIV-1 antibodies (Western Blot)	CD4 Count (/mm ³) CD4/ CD8 Ratio	HIV-RNA (Log cp /ml)	HIV-DNA (Log cp /10 ⁶ PBMC)	HIV-DNA (Log cp / mL)	Viral Subtype Tropism	HLA		CD4 Count (/mm3) CD4/ CD8 Ratio	HIV-DNA (Log cp /10 ⁶ PBMC)	Δ HIV-DNA (Log cp /10 ⁶ PBMC)	HIV-DNA (Log cp/mL)	Δ HIV-DNA (Log cp/mL)
1	M32	Yes	30	0	163 0.27	>7	4.50	4.60	B R5	B(1) 35	B(2) 51	668 1.18	3.27	-1. 23	3.53	-1.07
2	M24	No	32	3	381 0.20	6.51	3.96	4.55	CRF02 R5	39	44	791 0.42	2.22	-1.74	2.65	-1.9
3	M23	Yes	55	3	332 0.18	5.42	4.04	4.55	B R5	8	50	427 0.38	2.61	-1.43	2.88	-1.67
4	M20	Yes	36	3	185 0.42	5.04	3.93	4.2	B R5	35	47	441 1.08	2.42	-1.51	2.56	-1.64
5	W56	Yes	27	3	370 0.16	5.20	3.17	3.59	C R5	35	48	780 2	2.57	-0.6	2.85	-0.74
6	M28	Yes	37	3	370 0.14	5.66	3.72	4.22	B R5	18	50	673 0.54	2.51	-1.21	2.88	-1.34
7	M32	Yes	26	3	708 0.14	5.88	3.45	4.32	B R5	13	60	919 1.22	2.25	-1.2	2.64	-1.67
8	M39	Yes	31	3	530 1.04	3.20	3.46	4.37	B R5	8	44	620 1.26	2.18	-1.28	2.41	-1.96
9	M47	Yes	38	3	368 0.23	5.70	3.55	4.07	B R5	37	51	634 0.37	1.92	-1.63	2.29	-1.78
10	M62	Yes	44	4	473 1.13	5.32	4.34	4.66	A R5	44	ND	809 1.29	2.53	-1.81	2.96	-1.7
11	M49	Yes	42	2	443 0.64	4.81	4.00	4.29	B	35	51	711 0.71	2.20	-1.8	2.48	-1.81
Median	83% M	92%	36	3	376	5.4	3.90	4.32	B 75%			673	2.42	-1.43	2.65	-1.67
[IQR25-75]	32 [24-49]		[30-41]		[341-516]	[5.0-5.8]	[3.48-4.30]	[4.20-4.55]				[620-791]	[2.20-2.57]	[-1.74- (-1.21)]	[2.40-2.88]	[-1.81-(-1.34)]

Table 2: Characteristics of the HIV-1-infected study participants

<i>Demographic Characteristics (median (IQR))</i>	2-year		6-year	PTC	<i>P-values (Kruskal-Wallis test)</i>
	<i>M0</i>	<i>M24</i>			
Number of participants	11		10	11	-
Frequency of male subjects (%)	91		100	73	
Age (years)	32 [24-49]		46 [41-54]	34 [31-48]	0.12
Contamination mode	Sexual contacts		Sexual contacts	Sexual Contacts	-
cART					
Timing of initiation of cART	-	36 [30-41] days	< 10 weeks	< 10 weeks	
Time under cART (months)	-	24	79 [38-142]	31 [17-56]	<0.001*
Interruption of cART (months)	-	-	-	101 [82-107]	-
Sampling point					
CD4+ T cell count (cells/mm3)	376 [341-516]	692 [624-805]	804 [657-983]	779 [502-1251]	0.35
Viral load (log copies/ml)	5.4 [5.0-5.8]	1.4 [1.3-1.6]	0.4 [0.2-0.6]	0.7 [0.4-0.8]	<0.001**
HIV-DNA load (log copies/million PBMCs) [IQR]	3.9 [3.5-4.3]	2.42 [2.25-2.57]	1.3 [0.7-1.7]	1.6 [1.1-2.1]	<0.001**

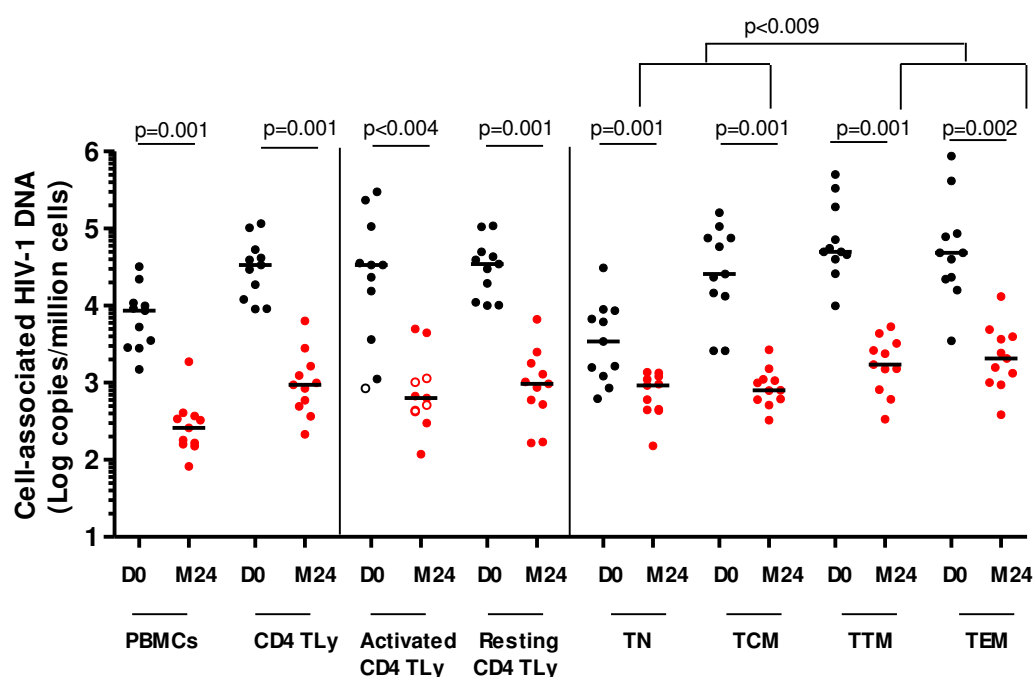


Figure 1: HIV-DNA load decrease after two years of early-cART

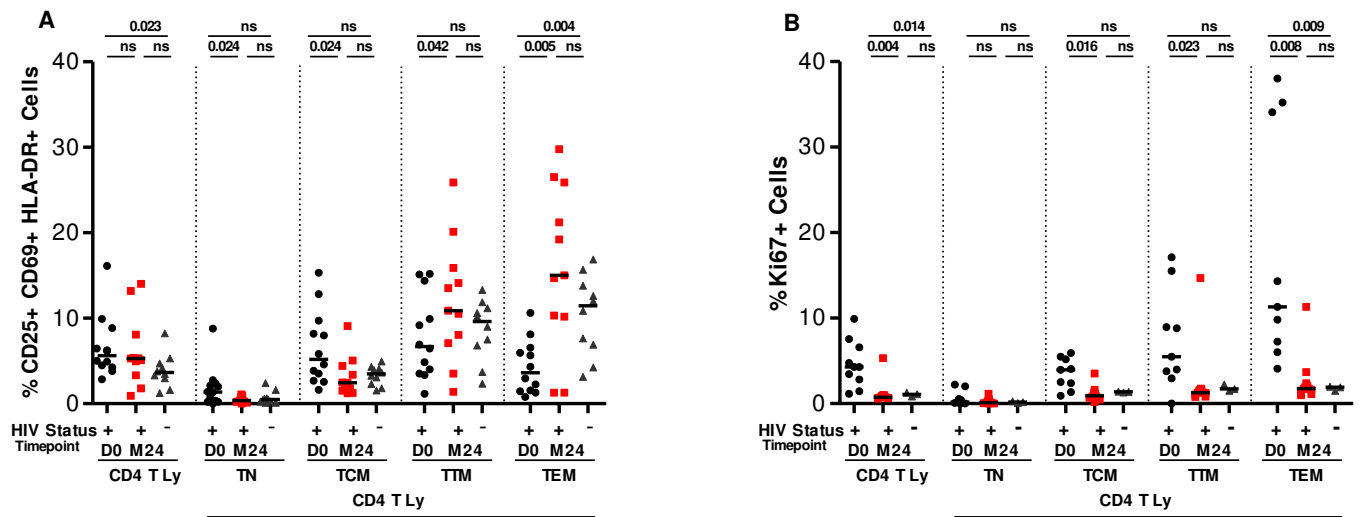


Figure 2: Analysis of the immune CD4 T cell activation

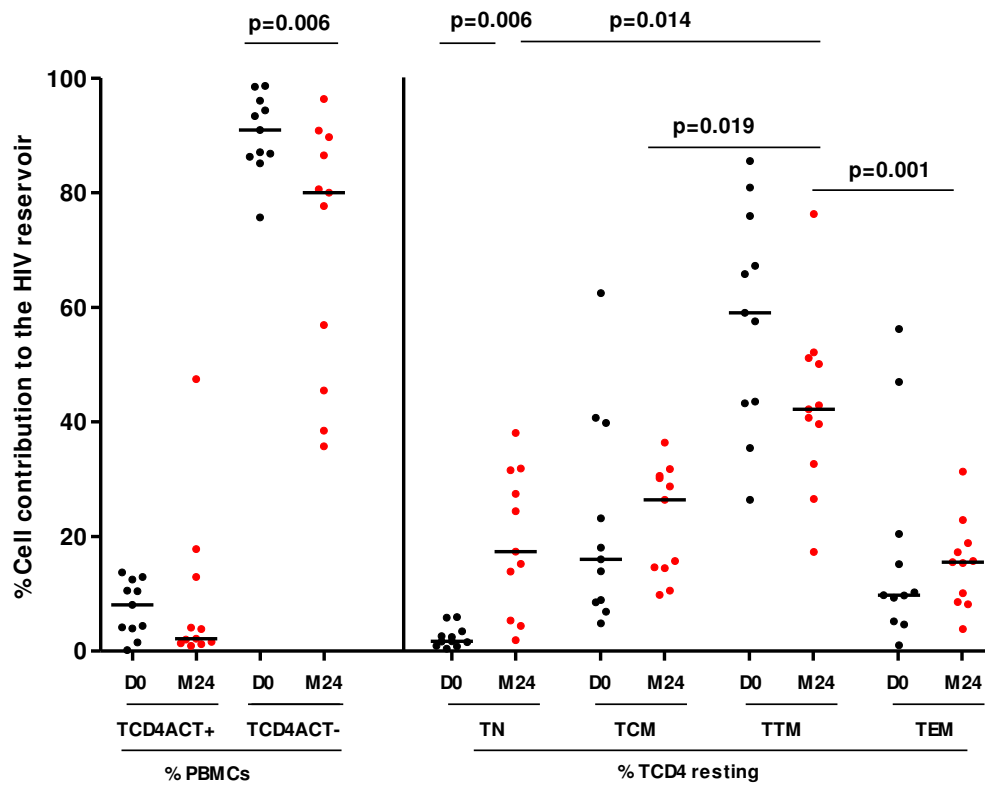


Figure 3: CD4 T cell subsets contribution to the pool of infected cells

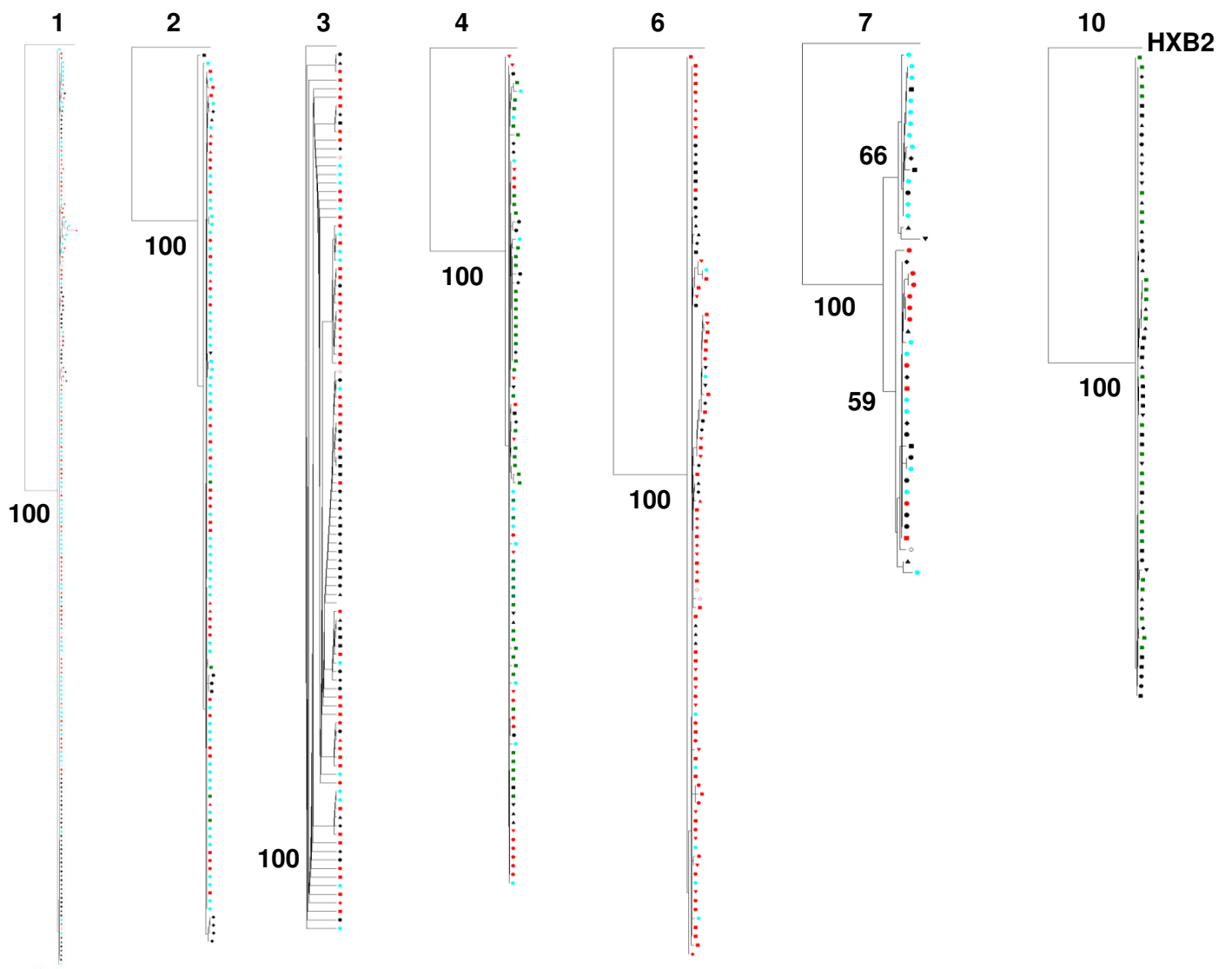


Figure 4: Viral diversity of the HIV

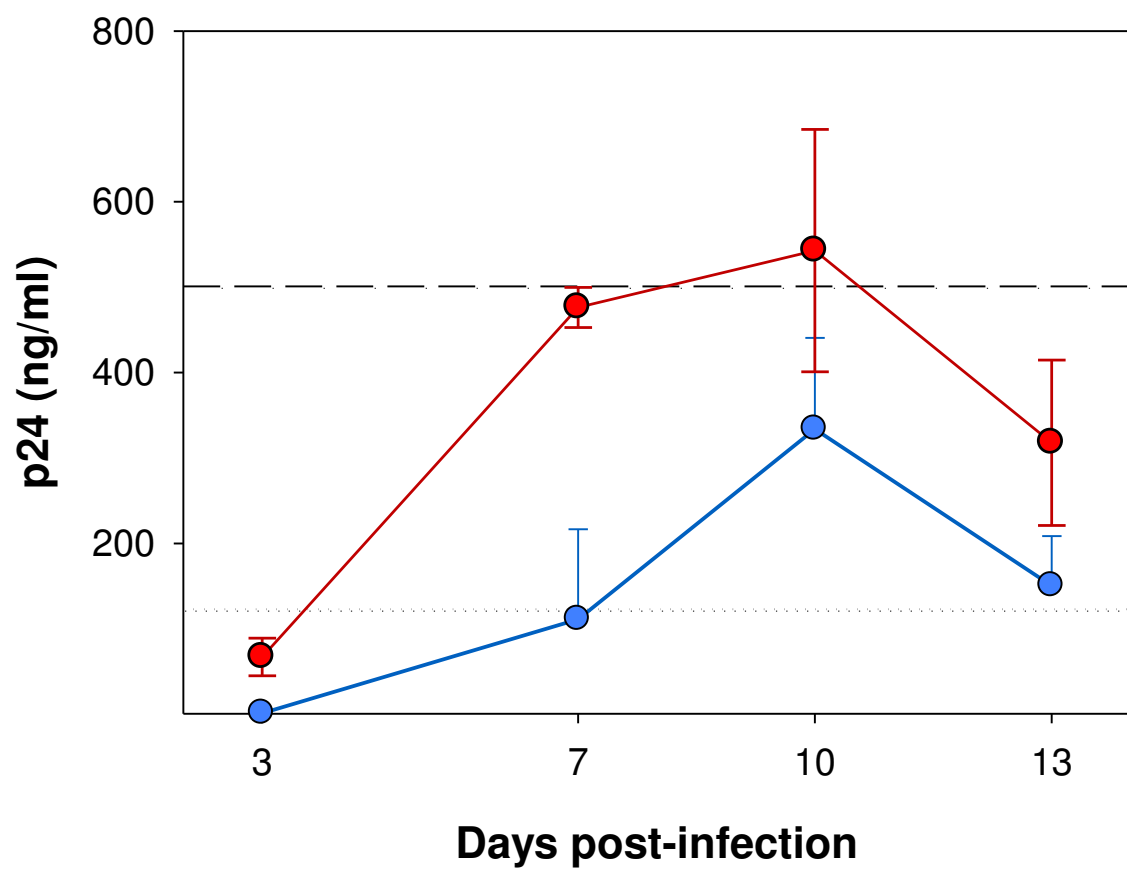


Figure 5: Replication competent viruses from patient #4 and #8 able to spread and infect heterologous cultures

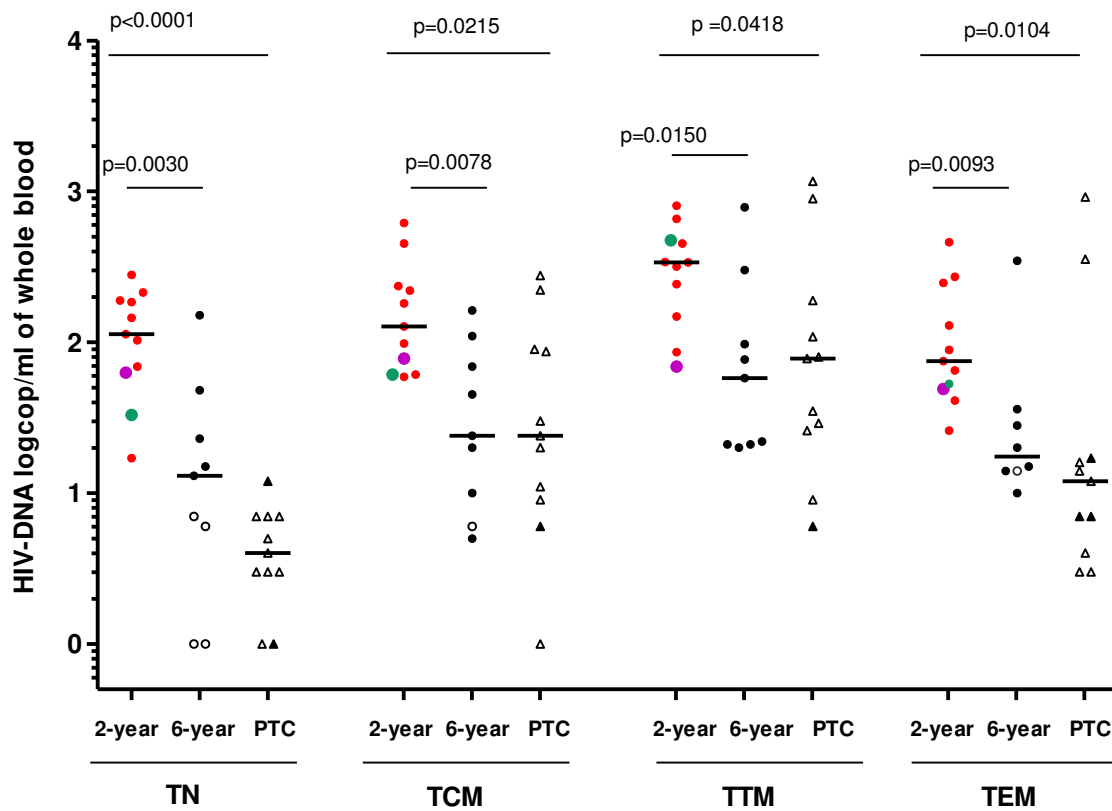


Figure 6 A: Two years of early-cART are not sufficient to reach the low HIV reservoir of PTCs

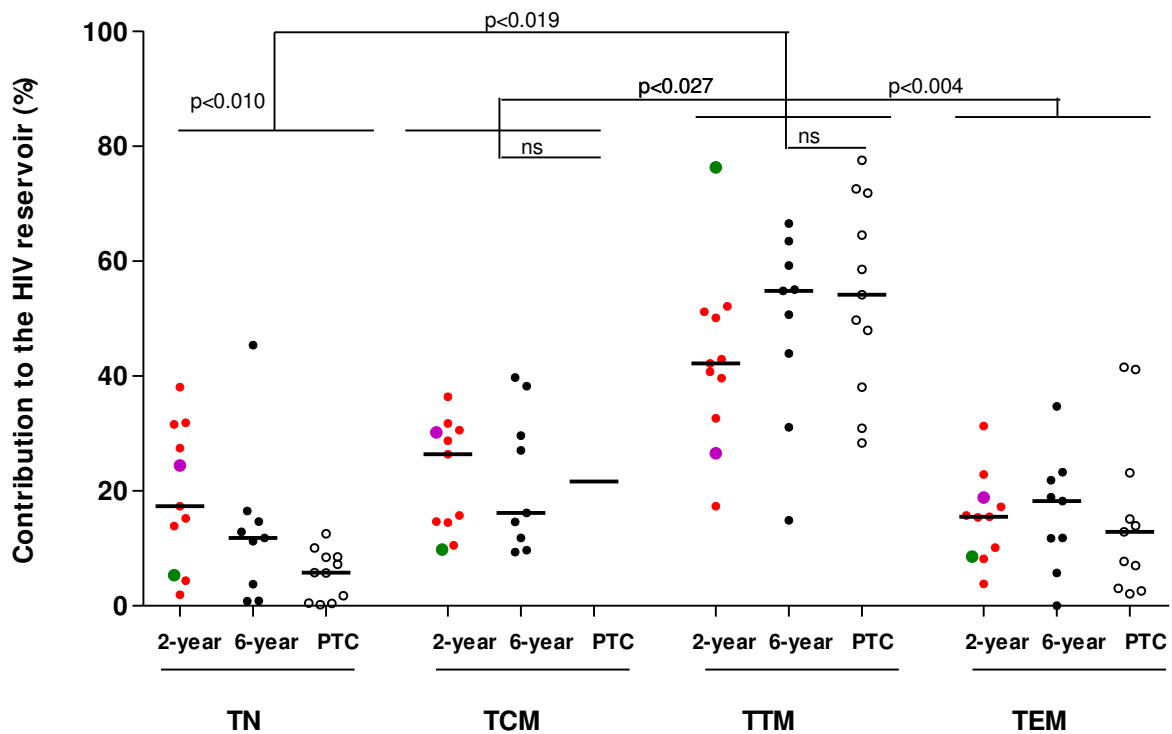


Figure 6 B: Two years of early-cART are not sufficient to reach the low HIV reservoir of PTCs

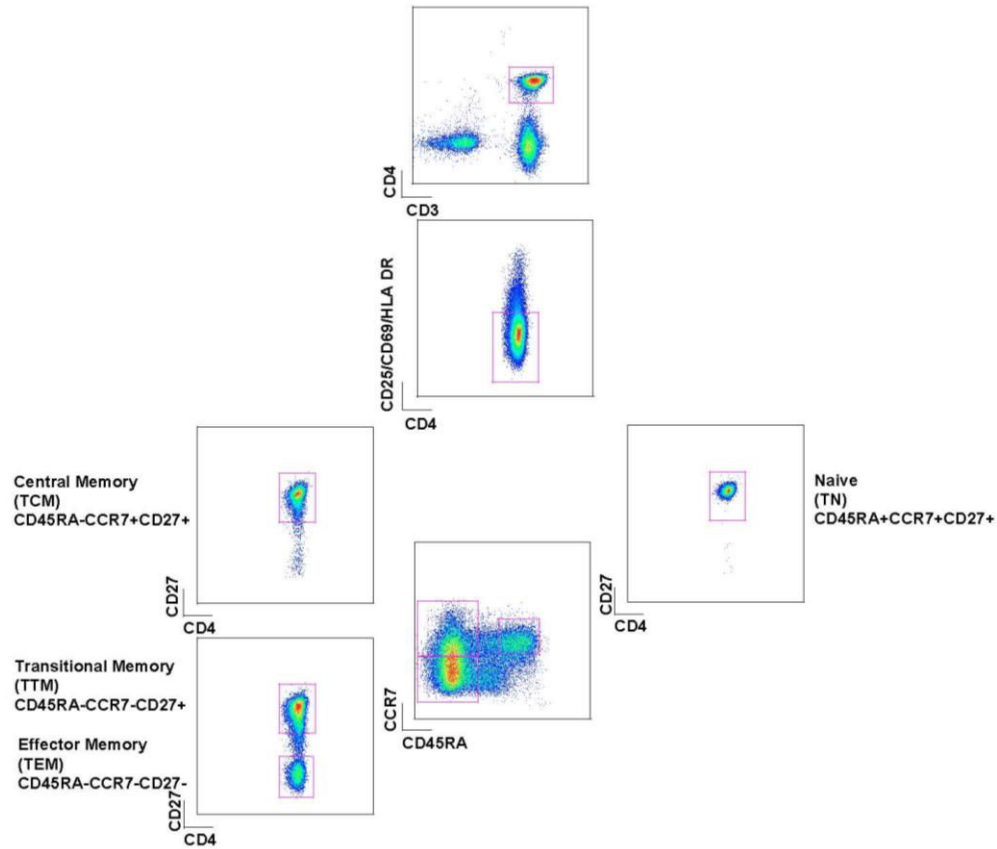


Figure S1: Cell sorting strategy.

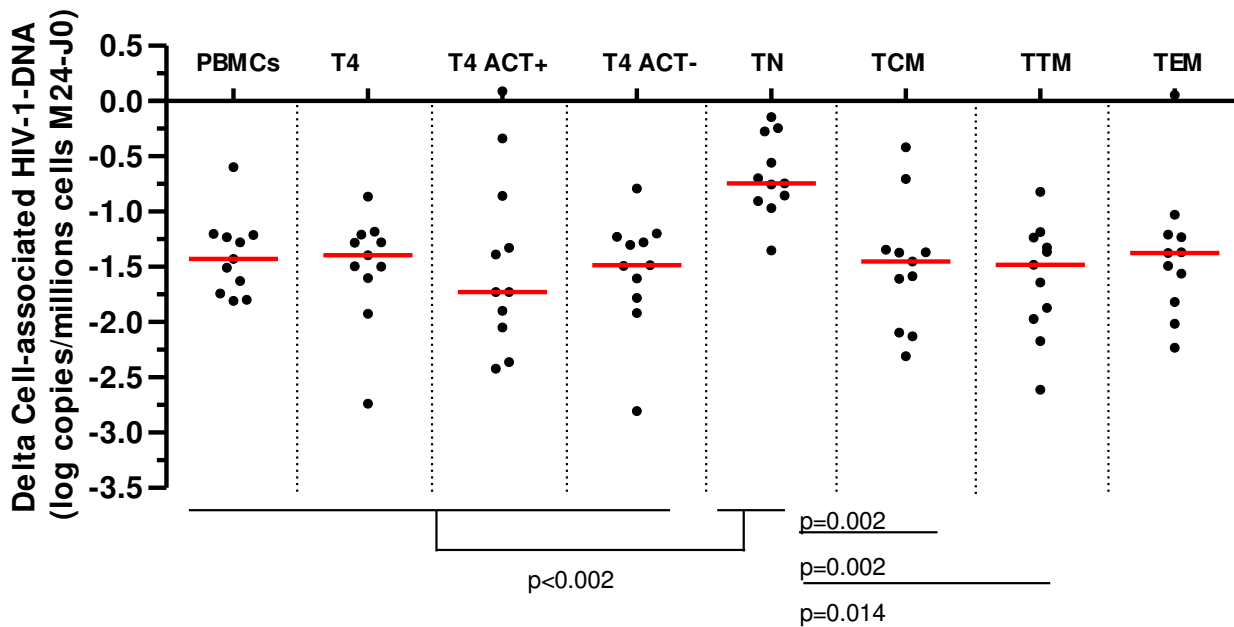


Figure S 2: Impact of two years of early-cART on HIV-1 reservoirs and CD4+ T cell homeostasis

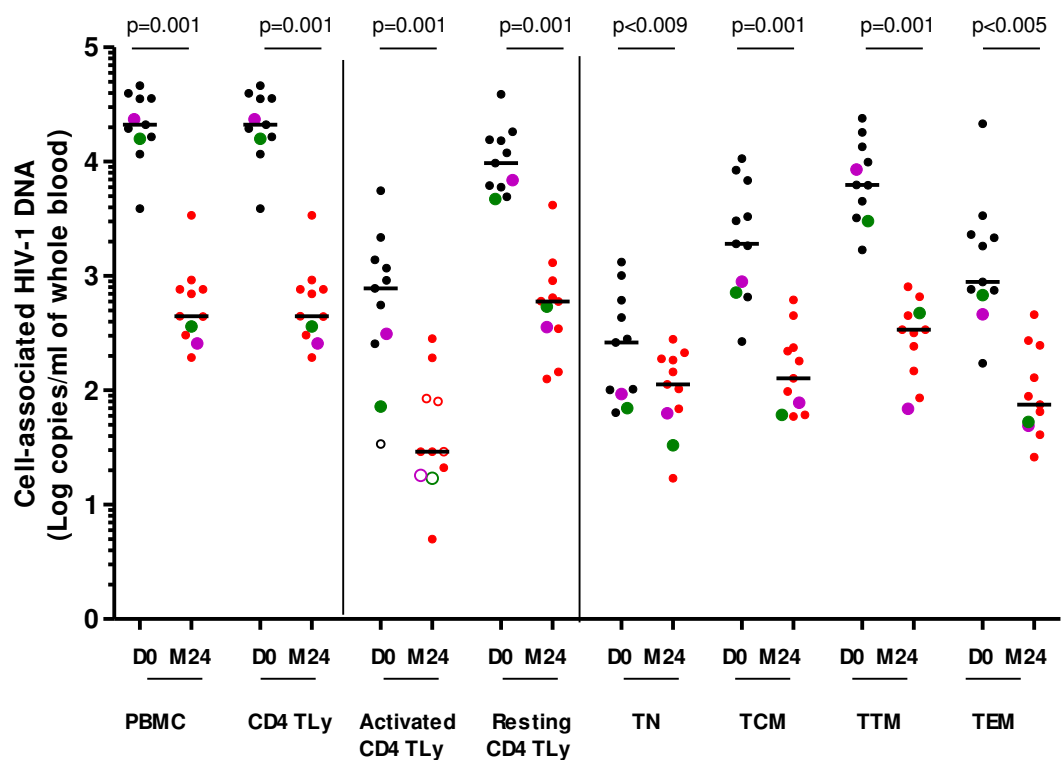


Figure S3A: HIV-DNA load decrease after two years of early-cART

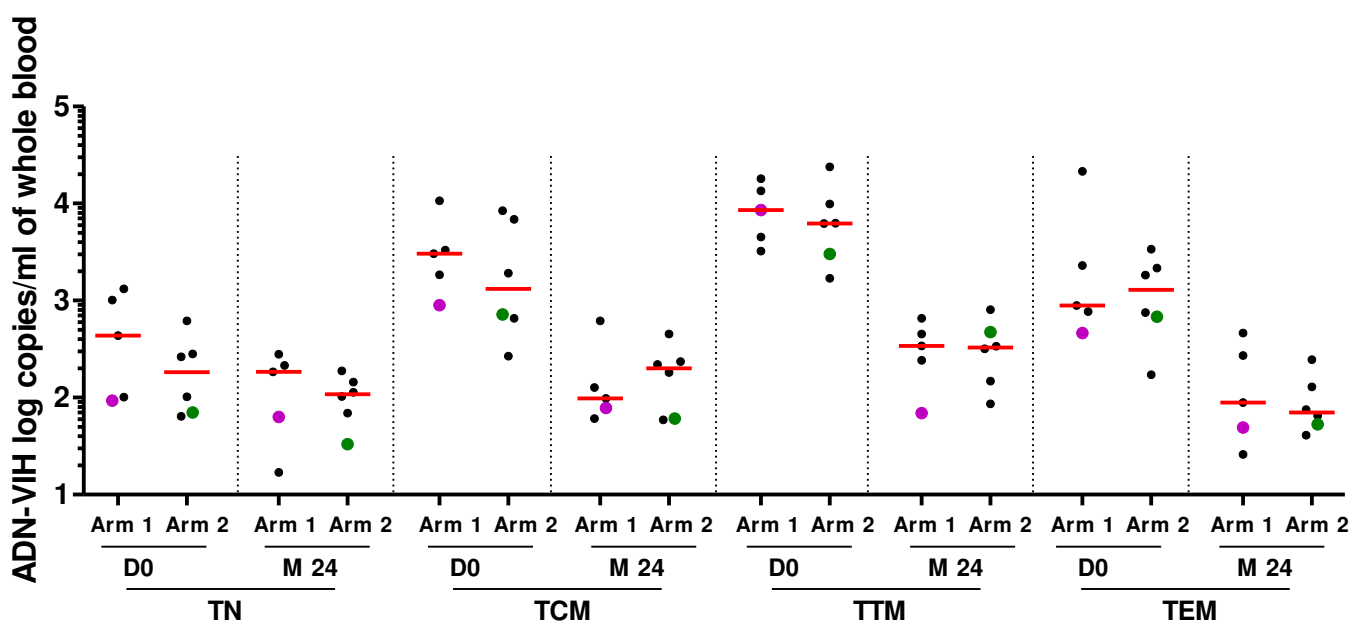


Figure S 3B: Impact of two years of early-cART on HIV-1 reservoirs and CD4+ T cell homeostasis

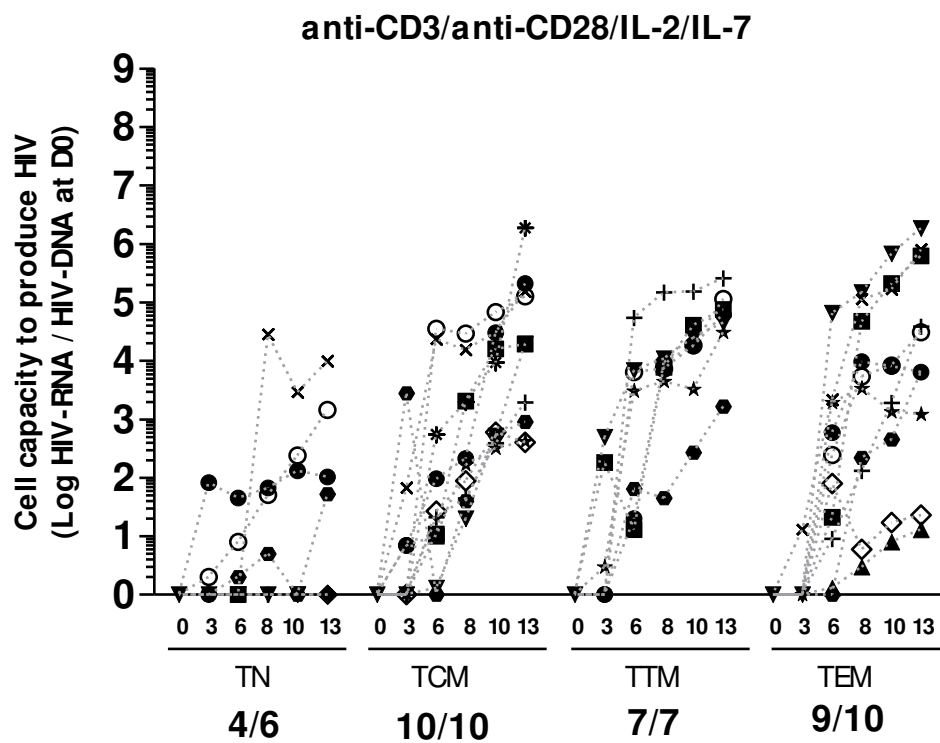


Figure S 4: HIV reactivation assay

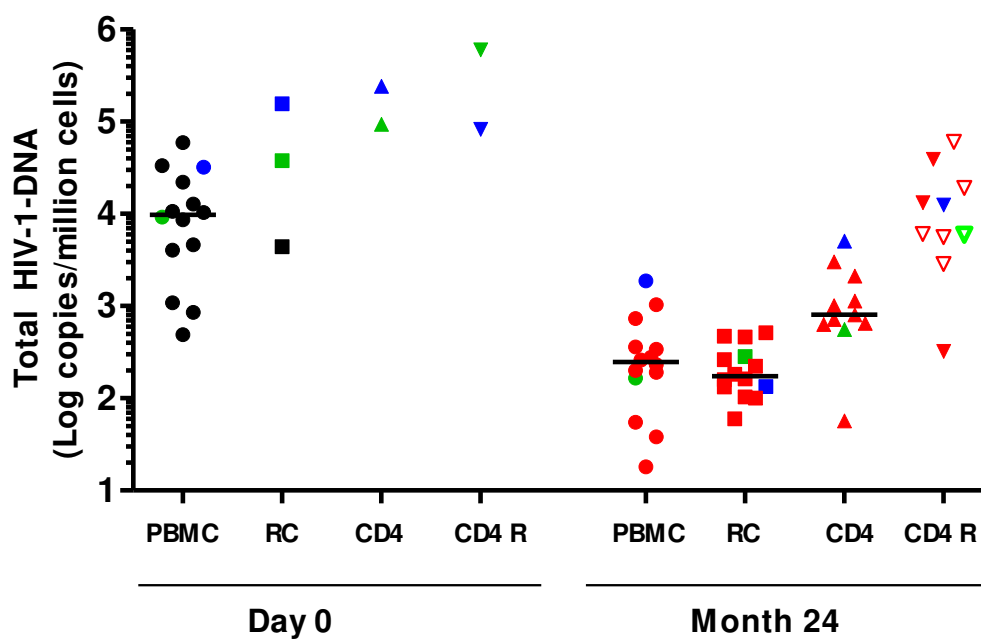


Figure S 5: HIV-DNA after two years of early-cART in sorted PBMC and Rectal Cells

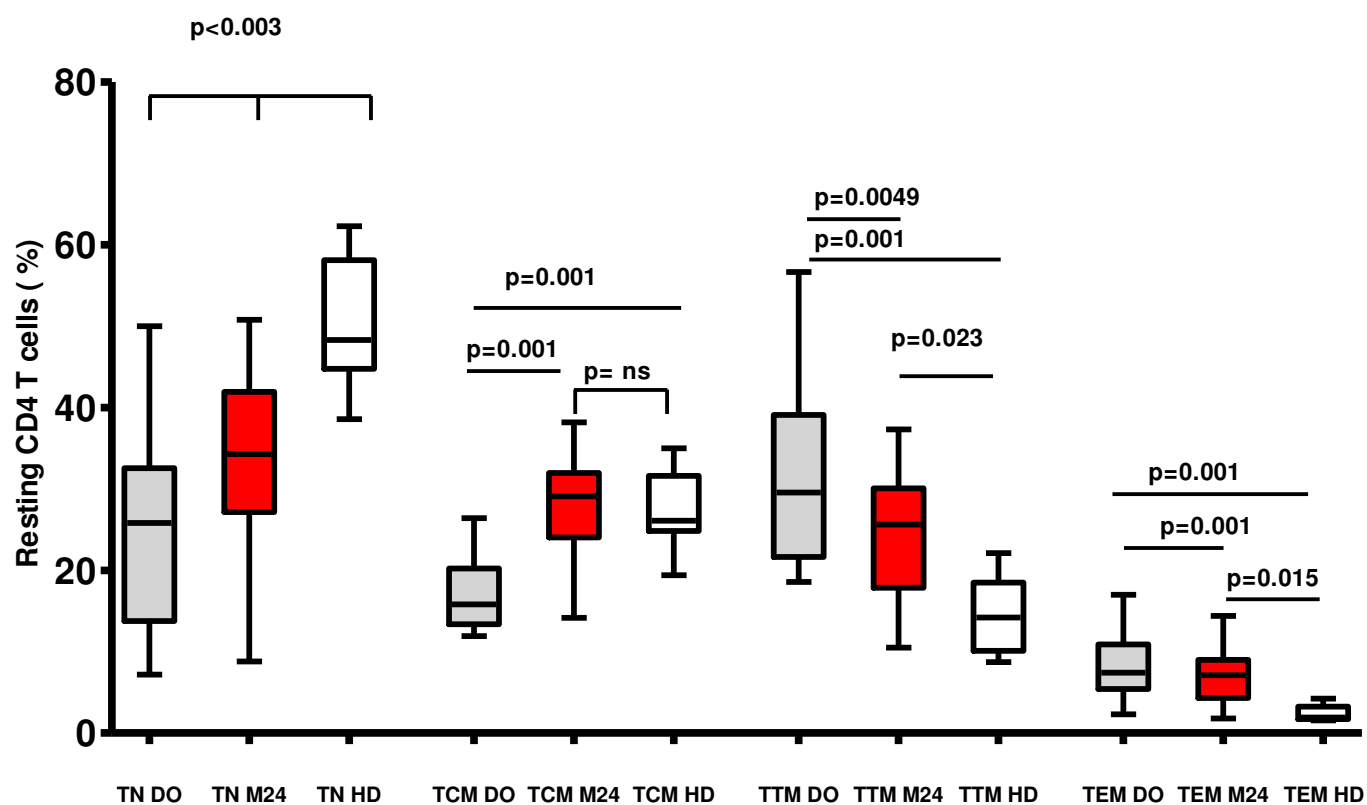


Figure S 6: CD4 T cell subsets repartition

6. Autres travaux en cours

Plusieurs études ancillaires sont en cours dans le protocole OPTIPRIM

1. Etude de l'immunité innée

Institut de cancérologie et d'immunologie de Marseille IFR 137, Pr Daniel Olive

Cette étude a pour objectif d'évaluer le bénéfice d'un traitement optimisé ou non, initié précocement en primo-infection, sur la diminution de l'hyperactivation de l'immunité innée et des altérations des réseaux NK-DC- monocytes qui permettront de préserver les réponses T. Cette étude teste spécifiquement les compartiments NK, DC et monocytes ainsi que leurs interactions fonctionnelles dans les premières phases de la primo-infection à J0 et M3 de notre essai.

2. Etude de l'immunité acquise

Unité INSERM 1012, Le kremlin Bicêtre, Dr Alain Venet, Camille Lécuroux

Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Institut Pasteur, Dr Gianfranco Pancino

Laboratoire d'immunologie Cellulaire et tissulaire, INSERM U543, Pr Brigitte Autran

Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Institut Pasteur, Dr Michaela Müller-Trutwin

-Etude de l'activation des lymphocytes T, globaux et spécifiques ainsi que les capacités fonctionnelles de synthèse d'IL-2 à JO et impact du traitement à M3 et M24.

-Parallèlement, nous poursuivons l'analyse après deux ans de traitement de la capacité suppressive anti-VIH des cellules T CD8 ex vivo.

-L'étude des niveaux d'activation entre les deux bras notamment au regard de la persistance de la réplication virale persistante dans le bras intense est complétée par le dosage des marqueurs plasmatiques d'activation et d'inflammation (chimio/cytokines pro-inflammatoires, cytokines anti-inflammatoires, marqueurs associés à la translocation bactérienne et à l'activation monocytaire) à J0, J3 et M24.

Ces trois dernières études concernent 25 patients par bras.

3. Etude pharmacologique

Laboratoire de pharmacologie, Hôpital Cochin, Pr Jean-Marc Treluyer

Nous allons analyser et décrire les concentrations de ténofovir, emtricitabine, darunavir, ritonavir, maraviroc et raltegravir en fonction du temps, estimer la variabilité interindividuelle et intra individuelle sur les paramètres décrivant la pharmacocinétique des 6 molécules, expliquer la variabilité interindividuelle par des facteurs démographiques et médicamenteux. Nous comparerons les concentrations (minimales et expositions) de darunavir/ritonavir, tenofovir et emtricitabine entre le bras 1 et le bras 2 et comparerons les concentrations de raltegravir et de maraviroc aux données publiées dans la littérature chez des patients qui n'auraient pas reçu de darunavir et identifieront à partir des résultats des dosages les patients non observant et voir s'ils sont plus nombreux dans le bras pentathérapie. Les prélèvements sanguins nécessaires ont été réalisés chez la totalité des patients de l'essai à M3, M6, M24.

4. Etude des réservoirs profonds

Laboratoire de Virologie, Hôpital Necker, Pr Christine Rouzioux

Quantification de l'ADN-VIH dans les cellules du sperme à J0 et M24 et évaluation de la réplication virale dans ce compartiment par quantification de l'ARN-VIH dans le liquide séminale. Cette étude en cours d'analyse a été réalisée chez 15 patients par bras.

5. Etude de la qualité de vie et de l'observance

INSERM U1018, Le Kremlin-Bicêtre, Pr Laurence Meyer

Evaluation aux différentes visites de l'essai de la qualité de vie qui viendra renforcer les résultats de l'étude pharmacologique et les études de l'immunité pour compléter la compréhension des résultats sur l'ADN-VIH et l'ARN-VIH obtenus dans l'essai OPTIPRIM.

6. Protocole OPTICE

En lien avec le TRT5, un dispositif d'accompagnement des patients dans le protocole (OPTICE) a été mis en place. Ce dispositif laisse la possibilité aux patients d'acquérir des informations auprès de différentes sources identifiées et formées dans le cadre de l'essai, avec notamment une ligne téléphonique dédiée par SIDA Info Service. Les résultats d'une étude de l'évaluation de la satisfaction des patients et de la performance du dispositif sont en cours d'analyse. Les premiers résultats seront présentés à l'AFRAVIH (Mai 2014).

OPTICE : une ligne téléphonique associative d'accompagnement des participants à l'essai ANRS 147

OPTIPRIM *Annie Le Palec, Hélène Pollard, Yann Mazens, Antoine Chéret, Caroline Lascoux-Combe, Laurence Meyer, Conseil Scientifique de l'essai Optiprim.*

Troisième partie : DISCUSSION

Plusieurs études réalisées dans les pays occidentaux suggèrent que les patients nouvellement infectés sont une source importante de contaminations à l'origine d'épidémies dans des groupes à risques [493-495]. Les patients présentent d'emblée de hauts niveaux de charge virale (d'autant plus élevés qu'ils sont symptomatiques) et le risque de transmission sexuelle est particulièrement élevé durant cette phase. Il est donc nécessaire d'élargir et d'améliorer le diagnostic précoce pour les patients en primo-infection aiguë et récente afin de casser ces chaînes de transmission. On peut donc supposer que l'impact du traitement antirétroviral pour diminuer le risque de transmission est d'autant plus efficace que le traitement est prescrit précocement. Les recommandations de traitements de l'infection à VIH des différentes sociétés savantes et rapports d'experts Français, Européens, Espagnoles, Américaines s'accordent depuis peu à recommander le traitement chez les patients en primo-infection [1, 391-394]. Les recommandations Françaises et Européennes précisent même de traiter précocement les patients, quel que soit leur niveau de CD4 et indépendamment de l'existence ou non de symptômes et au regard des bénéfices sur le plan collectif en termes de réduction de transmission virale.

Les traitements recommandés sont les mêmes que chez les patients en phase chronique, à savoir une combinaison de deux inhibiteurs nucléosidiques et un troisième agent un inhibiteur non nucléosidique, un inhibiteur de protéase, voire même un inhibiteur d'intégrase (ITI) par certains experts, en raison de sa puissance virologique et de sa diffusion dans le compartiment génital. Néanmoins, en France, l'utilisation comme troisième agent d'un inhibiteur de protéase en association avec deux inhibiteurs nucléosidiques (en privilégiant le ténofovir/emtricitabine) est clairement recommandée, dans l'attente des résultats du test génotypique de résistance. Cela, en raison de la puissance virologique de ces molécules, d'une barrière de résistance aux antirétroviraux plus élevée que pour les inhibiteurs non nucléosidiques et les inhibiteurs d'intégrase; ainsi que la circulation de 10 à 13% de souches portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux [77]. La moindre toxicité et la meilleure tolérance des traitements antirétroviraux actuels sont un atout important pour la prescription et la pérennité du schéma thérapeutique. Cependant, pour atteindre cet objectif il est nécessaire d'allier l'efficacité du traitement avec le coût, la

tolérance et la simplicité d'administration, pour une bonne adhésion du patient, laquelle doit être renforcée par un soutien à l'observance, mais aussi une bonne adhésion du prescripteur à l'intérêt de l'initiation très précoce des traitements.

Plusieurs études randomisées et études de cohortes citées précédemment, ont mis en évidence le fait qu'un traitement initié en primo-infection protégeait le système immunitaire, limitait l'amplification du réservoir par la régression de la taille du pool lymphocytaire quiescent infecté. Nos travaux montrent que le réservoir est déjà très établi dans le premier mois de l'infection au sein des lymphocytes T CD4 quiescents, comme cela avait été évalué dans des cellules quiescentes de patients à 10 jours des symptômes de la primo-infection [16] ou dans des stades précoces de la primo-infection [496]. Ainsi, les sous-populations lymphocytaires T CD4 naïves (TN), mémoires centrales (TCM), transitionnelles (TTM), effectrices (TEM) quiescentes présentent un niveau d'infection particulièrement élevé et une fréquence d'infection, similaire à celle rapportée par une seule étude, à un stade bien plus tardif de la primo-infection (à 225 jours de la séroconversion) [17].

Cependant, une des différences de notre travail est la mise en évidence de la perturbation de l'homéostasie lymphocytaire qui apparaît spécifique à cette phase précoce de la primo-infection et qui n'est pas observée dans les phases plus tardives [17]. Un seul virus fondateur qui n'a pas encore eu le temps de se diversifier, infecte massivement les différentes sous-populations lymphocytaires. A cette phase précoce de la primo-infection (36 jours), la contribution des TTM au réservoir est majeure. En revanche, les cellules quiescentes centrales mémoires à demi-vie longue et les naïves sont déjà infectées mais contribuent peu au réservoir.

Les sous-populations lymphocytaires T CD4 centrales mémoires et naïves sont les pierres angulaires de la réponse immunitaire adaptative et leur rôle est crucial dans la pathogénèse de la maladie comme cela a été souligné dans le modèle SIV [290, 291]. Ces cellules hébergent un virus compétent répliquatif, comme nous l'avons montré après activation des différentes sous-populations lymphocytaires en culture, confirmant leur rôle de réservoir quiescent au long cours. Un des éléments importants est l'état très particulier de subactivation des différentes sous-populations lymphocytaires qui produisent du virus spontanément en culture, que l'on peut facilement relier avec la cascade cytokinique [118].

Ainsi, cela explique la grande fréquence d'infection des cellules quiescentes qui sont les premières cibles du virus au tout début de l'infection particulièrement dans le GALT ou

elles expriment majoritairement le co-récepteur CCR5 (TTM, TEM) [33, 497]. La fréquence d'infection de ces cellules est similaire à celle des lymphocytes T CD4 activés, qui sont pourtant les plus susceptibles à l'infection par le VIH. Cela peut s'expliquer par l'élimination des cellules activées et TEM Ki67- productrices de virus suite aux effets cytopathogènes viraux, à l'action cytolytique du système immunitaire et leur probable migration dans les organes lymphoïdes, signifiant bien dans ces phases précoces l'atteinte majeure des lymphocytes T CD4.

Aussi, cette distribution singulière sur le plan quantitatif et qualitatif du réservoir dans les sous-populations lymphocytaires, combinée à l'absence chez la majorité de nos patients d'une activité T CD8 suppressive efficace qui joue un rôle clef chez les patients *HIV Controllers*, renforcent la pertinence d'évaluer l'impact d'un traitement précoce en primo-infection. Cela afin de limiter l'activation immunitaire, limiter l'infection des sous-populations lymphocytaires et la diversification virale et donc protéger de la constitution d'un réservoir diversifié et à longue durée de vie.

Nous montrons qu'un traitement de deux ans a permis une réduction significative du réservoir dans les PBMC mais aussi dans le tissu rectal. Le traitement a induit également une réduction des perturbations de l'homéostasie lymphocytaire par la restauration du nombre des différentes sous-populations. Cette réduction a également été rapportée dans d'autres études que le traitement soit très précoce [408] ou plus tardif en primo-infection [230]. Dans notre travail, nous démontrons la protection de l'infection des cellules lymphocytaires T CD4 mémoires centrales mais aussi des T CD4 naïfs. Ces deux sous-populations TN contribuent moins au réservoir que les transitionnelles mémoires à la différence de ce qui est observé chez des patients traités en phase chronique de l'infection où les centrales mémoires contribuent majoritairement [245].

Le réservoir chez les patients chroniques est alors essentiellement situé dans ces lymphocytes TCM à demi-vie longue qui assurent une persistance virale au long cours par prolifération (Figure 13 A). Nos résultats montrent que, chez des patients traités en primo-infection, les cellules TTM et TEM représentent majoritairement le réservoir (Figure 13 B) alors qu'elles ont une capacité de prolifération moindre et que leur nombre va diminuer plus rapidement que les TCM et les TN. Cela, en raison de leur demi-vie courte et de leur plus grande mortalité par une plus grande susceptibilité à l'activation et à la production virale (article I et IV). **Nous montrons donc que le traitement a figé cette contribution à JO, ce qui traduit que la dynamique d'établissement du réservoir se fait bien au-delà du**

premier mois de la primo-infection. Cet effet est très probablement lié à l'inhibition de la réplication virale et de la cascade cytokinique qui y était associée, limitant ainsi l'activation des lymphocytes mémoires et l'infection de nouvelles cellules [408].

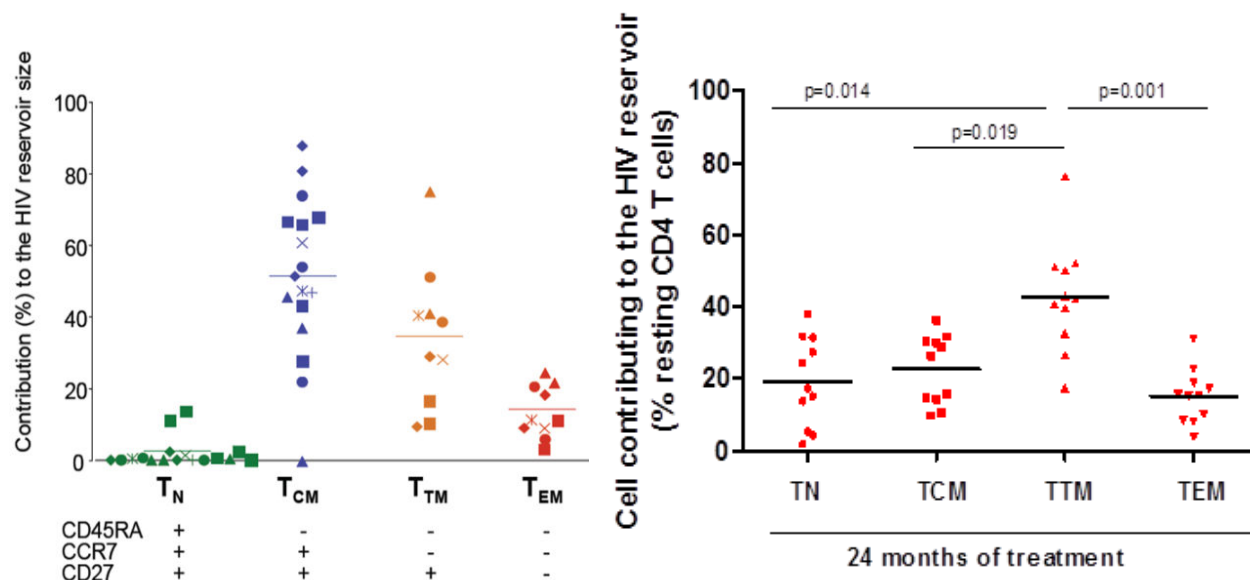


Figure 13 : A. Contribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires chez 10 patients en phase chronique de l'infection par le VIH et traités, d'après Chomont et al [245] B. Contribution du réservoir dans les différentes sous-populations lymphocytaires chez 11 patients après deux ans de traitement initié en primo-infection (Essai OPTIPRIM ANRS 147).

Ainsi, si le niveau de réservoir est un bon indicateur d'efficacité thérapeutique, il n'a pas la même valeur sur le plan quantitatif et sur le plan qualitatif chez les patients en primo-infection et chez les patients chroniques traités. La demi-vie du réservoir des patients traités en primo-infection est très probablement plus courte que chez des patients traités en phase chronique chez qui les cellules quiescentes à demi-vie plus longue sont infectées. Ces éléments expliquent l'impact plus important des traitements initiés en primo-infection sur la décroissance de l'ADN-VIH [376], mais expliquent également le fait que la décroissance de l'ADN-VIH peut se poursuivre au-delà d'un traitement de 24 mois (Article III). Néanmoins, les études qui ont évalué la demi-vie du réservoir suite à un traitement initié en primo-

infection, suggèrent que 60 ans de traitement ne seraient même pas suffisant pour éradiquer complètement le virus [260, 498].

La protection des cellules centrales mémoires et naïves de l'infection et donc de leur destruction semble d'autant plus efficace que le traitement est initié encore plus tôt ou il semble limiter la constitution du réservoir, comme cela a été rapporté chez des patients à risque d'acquisition du VIH qui étaient traités au stade Fiebig 1 [479]. Cependant, dans notre travail, nous montrons qu'un traitement, même dans des phases plus tardives (Fiebig III, IV) impacte cette dynamique d'établissement du réservoir. Les patients qui sont pris en charge au stade de primo-infection sont le plus souvent à des stades Fiebig III à V en raison des symptômes qu'ils présentent et qui les amènent à consulter. Ainsi, il existe clairement un bénéfice sur le réservoir à traiter et le plus rapidement possible tous les patients en primo-infection, même ceux diagnostiqués tardivement.

Ces éléments expliquent également qu'un traitement initié en primo-infection permet une bonne restauration immunitaire qui est d'autant meilleure que le traitement est initié chez des patients $T\ CD4 > 500/mm^3$ [376]. L'impact sur le système immunitaire est probablement supérieur sur le plan qualitatif que lors d'un traitement initié en phase chronique. En effet, le traitement facilite la conservation des réponses mémoires antigéniques spécifiques et non spécifiques du VIH, par la préservation de la poly-fonctionnalité des clones mémoires [378]. Il limite les dégâts sur la muqueuse digestive, le GALT et les translocations bactériennes associées à terme [485]. De plus un traitement précoce limite la diversité génétique déjà restreinte à JO. Le bénéfice attendu est un moindre épuisement des réponses épitopiques anti-VIH $T\ CD8$ qui sont ciblés sur le virus fondateur. Aussi, limiter l'émergence de mutants devrait faciliter l'action des $T\ CD8$ qui reconnaissent essentiellement les épitopes viraux initiaux [436] et faciliter le contrôle virologique par le système immunitaire [119].

Enfin, il faut souligner le fait que la protection de l'infection des cellules centrales mémoires et des lymphocytes $T\ CD4$ naïfs est un des facteurs retrouvés chez les patients VISCONTI (PTCs), mais aussi chez les patients porteurs d'allèles protecteurs HLA-B*27-57 et chez les singes de type Sooty Mangabeys [480]. Cette protection des TCM est donc retrouvée dans différents profils d'évolution favorable. Le facteur associé à cet état est un faible niveau de réservoir, principalement dans les cellules $T\ CD4$ mémoires centrales et les lymphocytes naïfs. Les patients traités plus de 6 ans, que nous avons étudié, ont un profil

quasi similaire à celui des PTCs, à la différence des patients traités 2 ans dès la primo-infection. Ainsi, une durée de traitement de l'ordre de 6 ans est sans doute un élément important à prendre en compte, autant que celui de la précocité du traitement, pour diminuer au mieux le réservoir chez un maximum de patients et préserver leur système immunitaire. [499]. Cela pourrait probablement permettre d'augmenter le nombre de PTCs généré par un traitement en primo-infection, concept que nous avons prouvé au sein de cet essai randomisé (article III et IV).

L'avènement de nouvelles molécules antirétrovirales, mieux tolérées, puissantes avec une bonne diffusion dans certains tissus, ont incité plusieurs équipes ces dernières années, à évaluer l'impact sur le plan immuno-virologique de combinaison optimisée d'antirétroviraux agissant à différents niveaux de la réplication virale en primo-infection.

Ainsi, en plus de notre travail, trois études, moins robustes sur le plan méthodologique comme nous l'avons vu, n'ont pas permis de conclure à un bénéfice d'une pentathérapie par rapport à une trithérapie à la fois sur la restauration immunitaire, le niveau de réservoir et la réplication virale [468, 469, 479]. Nous validons dans notre étude randomisée, sur un effectif conséquent de patients, l'absence de bénéfice additionnel d'une pentathérapie contenant du raltégravir et du maraviroc à 36 jours de la date de contamination. Par contre, nous montrons un très bon impact de l'association emtricitabine/ténofovir + Darunavir/r en une prise par jour sur l'ADN-VIH, l'ARN-VIH et sur les CD4. De façon non surprenante, nous avons constaté l'effet puissant du raltégravir sur l'inhibition de la réplication virale dans les trois premiers mois de notre essai, ce que retrouve l'étude précédente. Néanmoins, nos effectifs plus importants, ainsi que le temps de traitement de 104 semaines plus long, nous ont permis de révéler l'impact relativement délétère de l'association raltégravir à du maraviroc en primo-infection, par le maintien d'une réplication virale persistante à faible niveau. Une hypothèse très probable est que cette réplication virale est liée aux effets versatiles du maraviroc sur l'activation et sur le *trafficking* cellulaire, comme cela a déjà été évoqué chez des patients traités en phase chronique et dans des phases plus tardives de la primo-infection [468, 491]. Cet effet du maraviroc qui « antagonise » l'action bénéfique du raltégravir sur la charge virale s'amende néanmoins à 24 mois de traitement. Ce rôle délétère du maraviroc a pu masquer les bénéfices escomptés sur la décroissance du réservoir, par un remplissage continu du réservoir en raison de la faible réplication virale pendant 15 mois.

Quatrième partie :

PERSPECTIVES et CONCLUSIONS

Les limites actuelles des antirétroviraux, même les plus puissants sont leur incapacité atteindre les différents compartiments [256] et les formes virales latentes contenues dans les lymphocytes T mémoires, responsables en partie de foyer de répliquions cryptiques, du relargage d'ARN viral par ces réservoirs stables, avec une transmission clonale de l'infection par division cellulaire [500]. Si nos travaux renforcent l'indication du traitement en primo-infection au regard de son impact sur l'homéostasie du réservoir et sur l'homéostasie lymphocytaire, la question du choix des molécules et de leur combinaison en primo-infection reste encore à approfondir. Ainsi, obtenir une décroissance rapide la plus précoce possible de la réplication virale visant à réduire le niveau de réservoir, les dégâts immunologiques et le risque de transmission nous paraît être une hypothèse tout à fait valide. Nos résultats avec une pentathérapie ne réfutent pas l'utilisation d'un inhibiteur d'intégrase en association avec une trithérapie par emtricitabine/ténofovir plus darunavir/r. En effet, le délai pour l'obtention d'une charge virale indétectable est beaucoup plus court dans le bras pentathérapie contenant du raltégravir. Néanmoins, dans notre travail, nous n'avons pas de bras quadrithérapie permettant de vérifier clairement cette hypothèse et de recommander l'utilisation d'un inhibiteur d'intégrase en primo-infection associée à une trithérapie avec darunavir/ritonavir plus ténofovir/emtricitabine. La mise en place d'un essai visant à contrôler au mieux et au plus vite la réplication virale et protéger les TCN et les TN serait une des pistes à envisager, avec l'utilisation du dolutégravir pour sa puissance virologique [501, 502] sa diffusion dans les compartiments, colorectaux [503], génitaux féminins [504], dans le liquide céphalorachidien [505], avec la prodrogue du ténofovir (ténofovir alafénamide) qui possède une excellente diffusion intracellulaire, une meilleure puissance antivirale avec une meilleure tolérance que le ténofovir [506], en association avec le darunavir/r qui a fait ses preuves dans l'essai OPTIPRIM. On pourrait alors espérer un bénéfice plus important de cette quadrithérapie par rapport à la trithérapie utilisée dans l'essai OPTIPRIM, sur le réservoir qui est particulièrement « plastique » en primo-infection par la modulation de son niveau et de sa

distribution, un bénéfice plus important par diminution rapide de l'activation et de l'apoptose des lymphocytes T CD4.

Cependant, le réservoir reste un obstacle à l'éradication et sur une intervention thérapeutique en primo-infection utilisant des molécules limitant l'activation et/ou agissant directement sur les mécanismes de la latence virale est une question à approfondir pour la mise en place de futurs essais cliniques.

Ainsi, un certain nombre de mécanismes d'établissement et de régulation de la maintenance des réservoirs que nous avons décrit dans la première partie de ce travail ont été élucidés ces dernières années et génèrent de nouvelles perspectives dans la recherche visant à l'éradication du VIH. Ces mécanismes permettent de tester différentes stratégies de stimulation des cellules latentes infectées *in vitro* et parfois *in vivo* suivant le concept de purge des réservoirs. Ces stratégies s'intéressent à ce jour principalement à la stimulation des voies d'activation cellulaires par l'interleukine 2 et l'interleukine 7 qui ont été étudiées et qui induisent une prolifération des cellules réservoirs sans réversion significative de la latence [507, 508]. De même, la réversion de la latence virale en agissant sur la structure chromatinienne par l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacetylases (HDACi) a été évaluée avec l'acide valproïque, mais sans succès [509]. Un autre HDACi est en cours d'étude chez les patients infectés par le VIH, l'acide suberanilohydroxamic (SAHA) dont les résultats à ce jour ne sont pas très encourageants en termes d'efficacité à induire une réversion importante de la latence virale dans les cellules quiescentes *in vivo* et en termes de tolérance de cet agent agressif, utilisé en cancérologie. Parallèlement, des stratégies de modification génétique des cellules de l'hôte (thérapie génique, transplantation de moelle osseuse) [510] dans le but de générer des cellules résistantes à l'infection par le VIH sont actuellement en cours d'étude. Ces stratégies de modification du phénotype CCR5 des cellules T CD4 ont été inspirées par le cas du « patient de Berlin » qui a subi plusieurs chimiothérapies et deux greffes de moelle osseuse avec les cellules d'un donneur qui présentaient une délétion homozygote CCR5 Δ 32 [511]. Plusieurs années après, aucune trace du virus n'était retrouvée chez ce patient dans les multiples prélèvements tissulaires effectués. L'approche vaccinale ou par immunomodulation sera également un atout pour renforcer le système immunitaire et faciliter l'élimination des cellules quiescentes après réactivation virale [512]. Cependant, considérant que l'éradication virale sera très difficile à réaliser chez un grand nombre de patients dans les décennies à venir, même dans le meilleur des cas impliquant l'accès précoce au traitement, la possibilité

d'induire une rémission au long cours sans traitement chez plus de patients traités précocement doit être un objectif à développer .

Le bénéfice obtenu avec un traitement initié en primo-infection pour préserver un système immunitaire compétent associé à un bas niveau de réservoir pour mieux contrôler la réplication virale explique que l'objectif d'une rémission soutenue à long terme est nettement plus atteignable que chez des patients traités en phase chronique. Néanmoins, si la diminution du réservoir est un élément indispensable, il est certain que d'autres facteurs interviennent. En effet, seuls 10 à 15 % des patients traités en primo-infection atteignent ce statut [475] et un seul des patients de l'étude OPTIPRIM présente un contrôle virologique optimal. Ainsi tant que ces facteurs prédictifs de contrôle n'auront pas été déterminés, il ne sera pas possible de proposer un arrêt de traitement aux patients traités au moment de la primo-infection dans des conditions optimales, même s'ils présentent un niveau de réservoir très bas. Le suivi des patients inclus dans la cohorte VISCONTI, du patient contrôleur de l'essai OPTIPRIM, avec l'analyse fine de l'évolution de leur réservoir et de leurs caractéristiques immunologiques permettra probablement de préciser ces facteurs associés au contrôle viral pour un arrêt des traitements antirétroviraux dans le cadre de futurs essais cliniques.

Un des challenges actuels est donc de faciliter le dépistage de l'infection à VIH, y compris chez des patients en phase précoce [513] et de débiter les traitements antirétroviraux au plus vite et au mieux avant l'apparition d'un niveau élevé de virémie plasmatique [16]. Pour cela, il faut renforcer les stratégies de dépistage en France, en particulier pour les sujets appartenant à des communautés exposées, en faisant notamment participer les médecins traitants à ce dispositif et en élargissant l'utilisation des tests rapides d'orientation et de diagnostic (TROD). De plus, il est nécessaire de faciliter l'accès rapide aux soins pour les sujets présentant une primo-infection. Dans ce sens, nous voudrions développer un programme d'assistance téléphonique qui, via le réseau de Sida Info Service permettrait en partenariat avec l'association AIDES, après accord avec un réseau de partenaires hospitaliers Français, d'orienter au plus vite vers une consultation spécialisée les patients diagnostiqués en primo-infection à VIH. Il paraît aussi très important de renforcer les réseaux ville-hôpital en assurant l'information des médecins généralistes référents, lesquels sont souvent les premiers consultés en cas de manifestations cliniques ou en cas de situations à risque d'exposition au

VIH. Ces patients pourront alors bénéficier d'une prise en charge et d'un traitement le plus précoce possible.

Au total, avec les résultats de ces travaux qui démontrent un important bénéfice du traitement en primo-infection par la réduction du réservoir et par la protection des sous-populations lymphocytaires naïves et centrales mémoires TCM de l'infection, nous disposons maintenant d'arguments physiopathologiques solides, pour recommander de traiter tous les patients en primo-infection. Nous prouvons également le concept, qu'un traitement antirétroviral initié en primo-infection permet à certains patients de contrôler au long cours la réplication virale après arrêt du traitement. Ce statut VISCONTI peut donc être atteint grâce à une trithérapie en une prise par jour par ténofovir/emtricitabine plus darunavir/ritonavir. Cette combinaison se révèle excellente au regard de son efficacité immunovirologique et de sa tolérance en primo-infection. En revanche, l'utilisation du maraviroc par ses effets immuno-modulateurs ne devrait pas être recommandée en primo-infection pendant cette période critique de l'infection où le système immunitaire présente de hauts niveaux d'activation.

Enfin, nous sommes convaincus que les informations issues de notre travail pourraient être prises en compte pour l'élaboration des futurs essais thérapeutiques visant à induire une rémission au long cours chez plus de patients, voire à induire l'éradication virale, alors que les patients traités en primo-infection seront sans doute les meilleurs candidats à de tels traitements anti-latence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH, recommandations du groupe d'experts sous la direction du Professeur P. Morlat. La documentation Française. Paris : 2013. 476 p. URL: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf (Consulté le 30 Mars 2014).
2. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. *WHO Library Cataloguing-in-Publication*. URL: <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/globalreport2013/> (consulté le 30 Mars 2014)
3. Marks G, Crepaz N, Senterfitt JW, Janssen RS. Meta-analysis of high-risk sexual behavior in persons aware and unaware they are infected with HIV in the United States: implications for HIV prevention programs. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2005;**39**:446-453.
4. Cazein F, Le Strat, Y., Le Vu, S., Pillonel, J., Lot, F., Couturier, S., and Semaille, C. Dépistage de l'infection par le VIH en France, 2003-2011. *Bull.Epidémiologique Hebd.* 529-533 2102b.
5. Pilcher CD, Tien HC, Eron JJ, Jr., Vernazza PL, Leu SY, Stewart PW, *et al.* Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV. *The Journal of infectious diseases* 2004;**189**:1785-1792.
6. Jacquez JA, Koopman JS, Simon CP, Longini IM, Jr. Role of the primary infection in epidemics of HIV infection in gay cohorts. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 1994;**7**:1169-1184.
7. Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, *et al.* Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *The Journal of infectious diseases* 2005;**191**:1403-1409.
8. Pinkerton SD. How many sexually-acquired HIV infections in the USA are due to acute-phase HIV transmission? *AIDS* 2007;**21**:1625-1629.
9. Wilson DP. Data are lacking for quantifying HIV transmission risk in the presence of effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009;**23**:1431-1433.
10. Hollingsworth TD, Anderson RM, Fraser C. HIV-1 transmission, by stage of infection. *The Journal of infectious diseases* 2008;**198**:687-693.
11. Frange P, Meyer L, Deveau C, Tran L, Goujard C, Ghosn J, *et al.* Recent HIV-1 infection contributes to the viral diffusion over the French territory with a recent increasing frequency. *PloS one* 2012;**7**:e31695.
12. Brenner BG, Roger M, Routy JP, Moisi D, Ntemgwa M, Matte C, *et al.* High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 2007;**195**:951-959.
13. English S, Katzourakis A, Bonsall D, Flanagan P, Duda A, Fidler S, *et al.* Phylogenetic analysis consistent with a clinical history of sexual transmission of HIV-1 from a single donor reveals transmission of highly distinct variants. *Retrovirology* 2011;**8**:54.
14. Castor D, Low A, Evering T, Karmon S, Davis B, Figueroa A, *et al.* Transmitted drug resistance and phylogenetic relationships among acute and early HIV-1-infected individuals in New York City. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2012;**61**:1-8.
15. Le Vu S, Velter A, Meyer L, Peytavin G, Guinard J, Pillonel J, *et al.* Biomarker-based HIV incidence in a community sample of men who have sex with men in Paris, France. *PloS one* 2012;**7**:e39872.
16. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;**95**:8869-8873.

17. Ganesan A, Chattopadhyay PK, Brodie TM, Qin J, Gu W, Mascola JR, *et al.* Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. *The Journal of infectious diseases* 2010,**201**:272-284.
18. Kaul R, Pettengell C, Sheth PM, Sunderji S, Biringer A, MacDonald K, *et al.* The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. *Journal of reproductive immunology* 2008,**77**:32-40.
19. Baeten JM, Donnell D, Kapiga SH, Ronald A, John-Stewart G, Inambao M, *et al.* Male circumcision and risk of male-to-female HIV-1 transmission: a multinational prospective study in African HIV-1-serodiscordant couples. *AIDS* 2010,**24**:737-744.
20. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, *et al.* Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* 2007,**26**:257-270.
21. Boggiano C, Littman DR. HIV's vagina travelogue. *Immunity* 2007,**26**:145-147.
22. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 1999,**286**:1353-1357.
23. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 2010,**464**:217-223.
24. Sodora DL, Gettie A, Miller CJ, Marx PA. Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS research and human retroviruses* 1998,**14 Suppl 1**:S119-123.
25. Butler DM, Delpont W, Kosakovsky Pond SL, Lakdawala MK, Cheng PM, Little SJ, *et al.* The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men. *Science translational medicine* 2010,**2**:18re11.
26. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008,**105**:7552-7557.
27. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 2005,**79**:9217-9227.
28. Lackner AA, Mohan M, Veazey RS. The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* 2009,**136**:1965-1978.
29. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature reviews. Microbiology* 2004,**2**:33-42.
30. Johnson LF, Lewis DA. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted diseases* 2008,**35**:946-959.
31. Poonia B, Wang X, Veazey RS. Distribution of simian immunodeficiency virus target cells in vaginal tissues of normal rhesus macaques: implications for virus transmission. *Journal of reproductive immunology* 2006,**72**:74-84.
32. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *The New England journal of medicine* 2011,**364**:1943-1954.
33. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, *et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005,**434**:1148-1152.
34. Poles MA, Elliott J, Taing P, Anton PA, Chen IS. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 2001,**75**:8390-8399.
35. Zhang ZQ, Wietgreffe SW, Li Q, Shore MD, Duan L, Reilly C, *et al.* Roles of substrate availability and infection of resting and activated CD4+ T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004,**101**:5640-5645.

36. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999,**401**:708-712.
37. de Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Stuyver L, *et al.* Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2008,**48**:241-244.
38. de Mendoza C, Rodriguez C, Garcia F, Eiros JM, Ruiz L, Caballero E, *et al.* Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007,**59**:698-704.
39. Eshleman SH, Husnik M, Hudelson S, Donnell D, Huang Y, Huang W, *et al.* Antiretroviral drug resistance, HIV-1 tropism, and HIV-1 subtype among men who have sex with men with recent HIV-1 infection. *AIDS* 2007,**21**:1165-1174.
40. Frange P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, *et al.* High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009,**64**:135-141.
41. Vassena L, Proschan M, Fauci AS, Lusso P. Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4+ and CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007,**104**:2355-2360.
42. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, *et al.* Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 2002,**76**:707-716.
43. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996,**271**:1582-1586.
44. Pasternak AO, Lukashov VV, Berkhout B. Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 2013,**10**:41.
45. Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 2001,**75**:3626-3635.
46. Sloan RD, Wainberg MA. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 2011,**8**:52.
47. Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL, *et al.* Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nature medicine* 2000,**6**:76-81.
48. Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, *et al.* Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *Journal of virology* 2004,**78**:6122-6133.
49. Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N, Daigle JE, Hughes S, Kellam P, *et al.* LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes & development* 2007,**21**:1767-1778.
50. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, *et al.* Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS pathogens* 2006,**2**:e60.
51. ROUZIOUX CA-FV. La quantification de l'ADN-VIH :ou, comment ,pourquoi? *virologie* 2009,**13**:S15-23.
52. Krishnan L, Engelman A. Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *The Journal of biological chemistry* 2012,**287**:40858-40866.
53. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 2013,**10**:67.

54. Verdin E, Paras P, Jr., Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *The EMBO journal* 1993,**12**:3249-3259.
55. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2005,**2**:69.
56. Barboric M, Peterlin BM. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol* 2005,**3**:e76.
57. Emiliani S, Van Lint C, Fischle W, Paras P, Jr., Ott M, Brady J, *et al.* A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996,**93**:6377-6381.
58. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, *et al.* Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2004,**9**:2388-2413.
59. Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M, Alcamí J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature reviews. Microbiology* 2009,**7**:798-812.
60. Lee HY, Giorgi EE, Keele BF, Gaschen B, Athreya GS, Salazar-Gonzalez JF, *et al.* Modeling sequence evolution in acute HIV-1 infection. *Journal of theoretical biology* 2009,**261**:341-360.
61. Sharova N, Swingle C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *The EMBO journal* 2005,**24**:2481-2489.
62. Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 2005,**201**:2023-2033.
63. Russell RA, Martin N, Mitar I, Jones E, Sattentau QJ. Multiple proviral integration events after virological synapse-mediated HIV-1 spread. *Virology* 2013,**443**:143-149.
64. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *Journal of virology* 2000,**74**:6087-6095.
65. Schacker T. The role of secondary lymphatic tissue in immune deficiency of HIV infection. *AIDS* 2008,**22 Suppl 3**:S13-18.
66. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005,**434**:1093-1097.
67. Luteijn R, Sciaranghella G, van Lunzen J, Nolting A, Dugast AS, Ghebremichael MS, *et al.* Early viral replication in lymph nodes provides HIV with a means by which to escape NK-cell-mediated control. *European journal of immunology* 2011,**41**:2729-2740.
68. Lafeuillade A, Poggi C, Tamalet C, Profizi N. Human immunodeficiency virus type 1 dynamics in different lymphoid tissue compartments. *The Journal of infectious diseases* 1997,**176**:804-806.
69. Lackner AA, Veazey RS. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annual review of medicine* 2007,**58**:461-476.
70. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annual review of immunology* 1999,**17**:625-656.
71. Ribeiro Dos Santos P, Rancez M, Pretet JL, Michel-Salzat A, Messent V, Bogdanova A, *et al.* Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation. *PloS one* 2011,**6**:e19493.
72. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology* 2006,**7**:235-239.
73. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology* 1994,**68**:4650-4655.

74. Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, *et al.* The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology* 2007,**4**:65.
75. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012,**2**.
76. Chaix ML, Seng R, Frange P, Tran L, Avettand-Fenoel V, Ghosn J, *et al.* Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013,**56**:880-887.
77. Chaix ML, Descamps D, Wirten M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, *et al.* Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *AIDS* 2009,**23**:717-724.
78. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, *et al.* Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2009,**206**:1273-1289.
79. Li H, Bar KJ, Wang S, Decker JM, Chen Y, Sun C, *et al.* High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS pathogens* 2010,**6**:e1000890.
80. Abrahams MR, Anderson JA, Giorgi EE, Seoghe C, Mlisana K, Ping LH, *et al.* Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *Journal of virology* 2009,**83**:3556-3567.
81. Haaland RE, Hawkins PA, Salazar-Gonzalez J, Johnson A, Tichacek A, Karita E, *et al.* Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS pathogens* 2009,**5**:e1000274.
82. Fischer W, Ganusov VV, Giorgi EE, Hraber PT, Keele BF, Leitner T, *et al.* Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. *PloS one* 2010,**5**:e12303.
83. Frater AJ, Edwards CT, McCarthy N, Fox J, Brown H, Milicic A, *et al.* Passive sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants and adaptation in new hosts. *Journal of virology* 2006,**80**:7226-7234.
84. Kearney M, Maldarelli F, Shao W, Margolick JB, Daar ES, Mellors JW, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 population genetics and adaptation in newly infected individuals. *Journal of virology* 2009,**83**:2715-2727.
85. Milicic A, Edwards CT, Hue S, Fox J, Brown H, Pillay T, *et al.* Sexual transmission of single human immunodeficiency virus type 1 virions encoding highly polymorphic multisite cytotoxic T-lymphocyte escape variants. *Journal of virology* 2005,**79**:13953-13962.
86. Sagar M, Kirkegaard E, Long EM, Celum C, Buchbinder S, Daar ES, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) diversity at time of infection is not restricted to certain risk groups or specific HIV-1 subtypes. *Journal of virology* 2004,**78**:7279-7283.
87. Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, Deveau C, Viard JP, Galimand J, *et al.* HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* 2006,**20**:159-170.
88. Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral immunology* 2004,**17**:109-113.
89. Frange P, Meyer L, Jung M, Goujard C, Zucman D, Abel S, *et al.* Sexually-transmitted/founder HIV-1 cannot be directly predicted from plasma or PBMC-derived viral quasiespecies in the transmitting partner. *PloS one* 2013,**8**:e69144.
90. Sagar M, Laeyendecker O, Lee S, Gamiel J, Wawer MJ, Gray RH, *et al.* Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *The Journal of infectious diseases* 2009,**199**:580-589.
91. Avettand-Fenoel V, Hocqueloux L, Muller-Trutwin M, Prazuck T, Melard A, Chaix ML, *et al.* Greater diversity of HIV DNA variants in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *Journal of medical virology* 2011,**83**:1499-1507.

92. Matsuyama-Murata M, Inaba K, Horiuchi R, Fukazawa Y, Ibuki K, Hayami M, *et al.* Genetic similarity of circulating and small intestinal virus at the end stage of acute pathogenic simian-human immunodeficiency virus infection. *Frontiers in microbiology* 2013,**4**:204.
93. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical microbiology reviews* 2013,**26**:2-18.
94. Reynolds MR, Rakasz E, Skinner PJ, White C, Abel K, Ma ZM, *et al.* CD8+ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. *Journal of virology* 2005,**79**:9228-9235.
95. Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, *et al.* CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *Journal of immunology* 2004,**173**:2410-2418.
96. Kottlilil S, Jackson JO, Reitano KN, O'Shea MA, Roby G, Lloyd M, *et al.* Innate immunity in HIV infection: enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2007,**46**:151-159.
97. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of infectious diseases* 1999,**179**:859-870.
98. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, *et al.* Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 2003,**17**:1881-1888.
99. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004,**104**:942-947.
100. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, *et al.* T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2003,**187**:1534-1543.
101. Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, Mlisana K, *et al.* Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 2010,**24**:819-831.
102. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature medicine* 1995,**1**:129-134.
103. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, *et al.* Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 2003,**18**:441-452.
104. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallerian F, Bart PA, Pantaleo G. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005,**102**:7239-7244.
105. Borrow P, Bhardwaj N. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 2008,**3**:36-44.
106. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual review of immunology* 2003,**21**:265-304.
107. Lapenta C, Santini SM, Proietti E, Rizza P, Logozzi M, Spada M, *et al.* Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology* 1999,**263**:78-88.
108. Harari A, Petitpierre S, Vallerian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 2004,**103**:966-972.
109. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigueon S, Vingert B, Sinet M, *et al.* Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human

- immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *Journal of virology* 2007,**81**:13904-13915.
110. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature immunology* 2002,**3**:1061-1068.
 111. Liovat AS, Rey-Cuille MA, Lecuroux C, Jacquelin B, Girault I, Petitjean G, *et al.* Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. *PloS one* 2012,**7**:e46143.
 112. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, *et al.* Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *The Journal of clinical investigation* 2009,**119**:3544-3555.
 113. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology* 2005,**23**:307-336.
 114. Piali L, Weber C, LaRosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, *et al.* The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *European journal of immunology* 1998,**28**:961-972.
 115. Lane BR, King SR, Bock PJ, Strieter RM, Coffey MJ, Markovitz DM. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* 2003,**307**:122-134.
 116. Foley JF, Yu CR, Solow R, Yacobucci M, Peden KW, Farber JM. Roles for CXC chemokine ligands 10 and 11 in recruiting CD4+ T cells to HIV-1-infected monocyte-derived macrophages, dendritic cells, and lymph nodes. *Journal of immunology* 2005,**174**:4892-4900.
 117. Zunich KM, Lane HC. Immunologic abnormalities in HIV infection. *Hematology/oncology clinics of North America* 1991,**5**:215-228.
 118. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, *et al.* Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *Journal of virology* 2009,**83**:3719-3733.
 119. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* 2010,**10**:11-23.
 120. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z, *et al.* Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PloS one* 2011,**6**:e28680.
 121. Clerici M. Beyond IL-17: new cytokines in the pathogenesis of HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 2010,**5**:184-188.
 122. Miller E, Bhardwaj N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological reviews* 2013,**254**:170-189.
 123. Borrow P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 2011,**6**:353-363.
 124. Cummings JS, Cairo C, Armstrong C, Davis CE, Pauza CD. Impacts of HIV infection on Vgamma2Vdelta2 T cell phenotype and function: a mechanism for reduced tumor immunity in AIDS. *J Leukoc Biol* 2008,**84**:371-379.
 125. Soumelis V, Scott I, Gheys F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, *et al.* Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001,**98**:906-912.
 126. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbeni M, Perie L, *et al.* Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 2008,**112**:4598-4608.
 127. Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, Levy JA. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS* 2006,**20**:1247-1252.

128. Meyers JH, Justement JS, Hallahan CW, Blair ET, Sun YA, O'Shea MA, *et al.* Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2007,**2**:e458.
129. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, *et al.* HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007,**104**:3396-3401.
130. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000,**100**:587-597.
131. Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, Clark G, *et al.* HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 2001,**98**:2482-2488.
132. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, *et al.* Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 1997,**14**:128-135.
133. Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, *et al.* Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994,**78**:389-398.
134. Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 2006,**108**:3808-3817.
135. Boasso A, Vaccari M, Nilsson J, Shearer GM, Andersson J, Cecchinato V, *et al.* Do regulatory T-cells play a role in AIDS pathogenesis? *AIDS reviews* 2006,**8**:141-147.
136. Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, Fuchs D, Nacsa J, Cecchinato V, *et al.* Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *Journal of virology* 2007,**81**:11593-11603.
137. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology* 2011,**6**:223-248.
138. Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, *et al.* Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 2007,**195**:1452-1460.
139. Fogli M, Mavilio D, Brunetta E, Varchetta S, Ata K, Roby G, *et al.* Lysis of endogenously infected CD4+ T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals. *PLoS pathogens* 2008,**4**:e1000101.
140. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, *et al.* Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1998,**102**:223-231.
141. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995,**270**:1811-1815.
142. Ward J, Bonaparte M, Sacks J, Guterman J, Fogli M, Mavilio D, *et al.* HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood* 2007,**110**:1207-1214.
143. Naranbhai V, Altfeld M, Karim SS, Ndung'u T, Karim QA, Carr WH. Changes in Natural Killer cell activation and function during primary HIV-1 Infection. *PLoS one* 2013,**8**:e53251.
144. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, *et al.* Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,**100**:15011-15016.
145. Fogli M, Mavilio D, Brunetta E, Varchetta S, Ata K, Roby G, *et al.* Lysis of endogenously infected CD4+ T cell blasts by rIL-2 activated autologous natural killer cells from HIV-infected viremic individuals. *PLoS Pathog* 2008,**4**:e1000101.

146. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, *et al.* Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,**102**:2886-2891.
147. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, *et al.* Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* 1998,**102**:223-231.
148. Kotttilil S, Chun TW, Moir S, Liu S, McLaughlin M, Hallahan CW, *et al.* Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis* 2003,**187**:1038-1045.
149. Mavilio D, Lombardo G, Kinter A, Fogli M, La Sala A, Ortolano S, *et al.* Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2006,**203**:2339-2350.
150. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, *et al.* Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 2005,**106**:3366-3369.
151. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 2001,**22**:633-640.
152. Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, David A, Luong TT, Nguyen NV, *et al.* Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J Immunol* 2003,**171**:5663-5667.
153. Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, *et al.* Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 2007,**109**:4296-4305.
154. Scott-Algara D, Arnold V, Didier C, Kattan T, Pirozzi G, Barre-Sinoussi F, *et al.* The CD85j+ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells. *PLoS ONE* 2008,**3**:e1975.
155. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007,**27**:406-416.
156. Kotttilil S, Shin K, Jackson JO, Reitano KN, O'Shea MA, Yang J, *et al.* Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *J Immunol* 2006,**176**:1107-1114.
157. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 2008,**9**:301-309.
158. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, *et al.* Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *Journal of immunology* 2002,**168**:1490-1495.
159. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer seminars in immunopathology* 1997,**18**:257-266.
160. Esiri MM, Morris CS, Millard PR. Sensory and sympathetic ganglia in HIV-1 infection: immunocytochemical demonstration of HIV-1 viral antigens, increased MHC class II antigen expression and mild reactive inflammation. *Journal of the neurological sciences* 1993,**114**:178-187.
161. Battegay M, Nuesch R, Hirschel B, Kaufmann GR. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *The Lancet infectious diseases* 2006,**6**:280-287.
162. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, *et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2009,**206**:1253-1272.
163. Saez-Cirion A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar

- cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007,**104**:6776-6781.
164. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* 1999,**283**:857-860.
 165. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, *et al.* Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *The Journal of experimental medicine* 1999,**189**:991-998.
 166. Autran B, Hadida F, Haas G. Evolution and plasticity of CTL responses against HIV. *Current opinion in immunology* 1996,**8**:546-553.
 167. Turnbull EL, Wong M, Wang S, Wei X, Jones NA, Conrod KE, *et al.* Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *Journal of immunology* 2009,**182**:7131-7145.
 168. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, *et al.* HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *Journal of virology* 2008,**82**:5398-5407.
 169. Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, Johnston MN, *et al.* HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8⁺ T Cell Response against HIV-1. *PLoS medicine* 2006,**3**:e403.
 170. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology* 1994,**68**:8056-8063.
 171. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, *et al.* Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *Journal of virology* 2004,**78**:4463-4477.
 172. Zaunders J, van Bockel D. Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. *Frontiers in immunology* 2013,**4**:95.
 173. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, *et al.* Insufficient production and tissue delivery of CD4⁺ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of experimental medicine* 2004,**200**:1299-1314.
 174. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine* 2006,**12**:289-295.
 175. Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA, *et al.* Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *The Journal of clinical investigation* 2003,**112**:956-966.
 176. Frahm MA, Picking RA, Kuruc JD, McGee KS, Gay CL, Eron JJ, *et al.* CD4⁺CD8⁺ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection. *Journal of immunology* 2012,**188**:4289-4296.
 177. Margolick JB, Gange SJ, Detels R, O'Gorman MR, Rinaldo CR, Jr., Lai S. Impact of inversion of the CD4/CD8 ratio on the natural history of HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2006,**42**:620-626.
 178. Chapon M, Randriamampita C, Maubec E, Badoual C, Fouquet S, Wang SF, *et al.* Progressive upregulation of PD-1 in primary and metastatic melanomas associated with blunted TCR signaling in infiltrating T lymphocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2011,**131**:1300-1307.
 179. Palmer BE, Neff CP, Lecureux J, Ehler A, Dsouza M, Remling-Mulder L, *et al.* In vivo blockade of the PD-1 receptor suppresses HIV-1 viral loads and improves CD4⁺ T cell levels in humanized mice. *Journal of immunology* 2013,**190**:211-219.
 180. Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, *et al.* Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2001,**193**:169-180.

181. Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Goujard C, Deveau C, Meyer L, *et al.* Weak anti-HIV CD8(+) T-cell effector activity in HIV primary infection. *The Journal of clinical investigation* 1999,**104**:1431-1439.
182. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *Journal of virology* 2001,**75**:11983-11991.
183. Draenert R, Verrill CL, Tang Y, Allen TM, Wurcel AG, Boczanowski M, *et al.* Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 2004,**78**:630-641.
184. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 2004,**22**:745-763.
185. Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, Rinaldo CR, *et al.* Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *The Journal of infectious diseases* 2000,**181**:872-880.
186. Costagliola D, Mary JY, Brouard N, Laporte A, Valleron AJ. Incubation time for AIDS from French transfusion-associated cases. *Nature* 1989,**338**:768-769.
187. Amadori A, De Rossi A, Faulkner-Valle GP, Chieco-Bianchi L. Spontaneous in vitro production of virus-specific antibody by lymphocytes from HIV-infected subjects. *Clinical immunology and immunopathology* 1988,**46**:342-351.
188. Schnittman SM, Lane HC, Higgins SE, Folks T, Fauci AS. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 1986,**233**:1084-1086.
189. Morris L, Binley JM, Clas BA, Bonhoeffer S, Astill TP, Kost R, *et al.* HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *The Journal of experimental medicine* 1998,**188**:233-245.
190. Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England journal of medicine* 1983,**309**:453-458.
191. Hart M, Steel A, Clark SA, Moyle G, Nelson M, Henderson DC, *et al.* Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *Journal of immunology* 2007,**178**:8212-8220.
192. Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, Atlas A, *et al.* Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 2006,**108**:1580-1587.
193. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, *et al.* Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *Journal of virology* 2008,**82**:12449-12463.
194. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, *et al.* Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 2004,**303**:2019-2022.
195. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003,**422**:307-312.
196. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *Journal of virology* 1998,**72**:6646-6656.

197. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvets DE, Pauley DR, Knight HL, *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998,**280**:427-431.
198. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* 2004,**200**:761-770.
199. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* 2004,**200**:749-759.
200. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, *et al.* Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS medicine* 2006,**3**:e484.
201. Anton PA, Elliott J, Poles MA, McGowan IM, Matud J, Hultin LE, *et al.* Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS* 2000,**14**:1761-1765.
202. Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvets DE, Forand AE, *et al.* Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Journal of virology* 2000,**74**:11001-11007.
203. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, *et al.* Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *The Journal of clinical investigation* 2012,**122**:62-69.
204. Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, *et al.* Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS* 2011,**25**:741-749.
205. Elhed A, Unutmaz D. Th17 cells and HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 2010,**5**:146-150.
206. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in immunology* 2007,**19**:377-382.
207. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 2006,**12**:1365-1371.
208. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends in microbiology* 2013,**21**:6-13.
209. Heise C, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S. Primary acute simian immunodeficiency virus infection of intestinal lymphoid tissue is associated with gastrointestinal dysfunction. *The Journal of infectious diseases* 1994,**169**:1116-1120.
210. George MD, Sankaran S, Reay E, Gelli AC, Dandekar S. High-throughput gene expression profiling indicates dysregulation of intestinal cell cycle mediators and growth factors during primary simian immunodeficiency virus infection. *Virology* 2003,**312**:84-94.
211. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, *et al.* Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *Journal of virology* 2008,**82**:538-545.
212. Chevalier MF, Petitjean G, Dunyach-Remy C, Didier C, Girard PM, Manea ME, *et al.* The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS pathogens* 2013,**9**:e1003453.
213. Santiago J. Specific gut bacterial flora is associated with higher CD4 % during HIV primary infection. In: *CROI*. Seattle; 2012.
214. Batman PA, Kapembwa MS, Griffin GE. Enteropathy associated with HIV. *Gut* 1990,**31**:960.
215. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Annals of internal medicine* 1996,**125**:257-264.

216. Daar ES, Pilcher CD, Hecht FM. Clinical presentation and diagnosis of primary HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 2008;**3**:10-15.
217. Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2007;**45**:445-448.
218. Ghosn J, Deveau C, Chaix ML, Goujard C, Galimand J, Zitoun Y, *et al.* Despite being highly diverse, immunovirological status strongly correlates with clinical symptoms during primary HIV-1 infection: a cross-sectional study based on 674 patients enrolled in the ANRS CO 06 PRIMO cohort. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010;**65**:741-748.
219. Abdel Babiker SD, Daniela De Angelis DE, Kholoud Porter. Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. Collaborative Group on AIDS Incubation and HIV Survival including the CASCADE EU Concerted Action. Concerted Action on SeroConversion to AIDS and Death in Europe. *Lancet* 2000;**355**:1131-1137.
220. Little SJ, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir DV. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 1999;**190**:841-850.
221. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, *et al.* CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;**42**:709-715.
222. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 1998;**339**:33-39.
223. YENI P. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH, recommandations du groupe d'experts. 2010:417.
224. HAUTE AUTORITE DE SANTE. Recommandations de santé publique. Dépistage de l'infection VIH en France. Stratégies et dispositifs de dépistage. Paris : HAS; 2009.41p; <http://www.has-sante.fr> (consulté le 30 Mars 2014).
225. Pavie J, Rachline A, Loze B, Niedbalski L, Delaugerre C, Laforgerie E, *et al.* Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. *PloS one* 2010;**5**:e11581.
226. Plan national de lutte contre le VIH/SIDA et les IST 2010-2014. PARIS. www.sante.gouv.fr. Ministère de la Santé et des Sports 2010:266.
227. Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, *et al.* LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *Journal of medical virology* 2009;**81**:217-223.
228. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 2003;**17**:1871-1879.
229. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annual review of medicine* 2002;**53**:557-593.
230. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, *et al.* Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *The Journal of infectious diseases* 2007;**195**:1762-1764.
231. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, *et al.* Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS pathogens* 2013;**9**:e1003174.
232. Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, Siliciano RF. Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *Journal of virology* 2003;**77**:1659-1665.
233. Wang X, Mosmann T. In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN-gamma-secreting cells. *The Journal of experimental medicine* 2001;**194**:1069-1080.
234. Kaeck SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* 2002;**2**:251-262.

235. Buzon M. Stem T memory cells are a long-term reservoir for HIV-1. In: *CROI 2013, Abstract 44* Atlanta; 2013.
236. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008;**73**:975-983.
237. Surh CD, Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Seminars in immunology* 2005;**17**:183-191.
238. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Current opinion in immunology* 2007;**19**:320-326.
239. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, *et al.* HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal* 2007;**26**:3025-3037.
240. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990;**61**:213-222.
241. Petitjean G, Al Tabaa Y, Tuaillon E, Mettling C, Baillat V, Reynes J, *et al.* Unintegrated HIV-1 provides an inducible and functional reservoir in untreated and highly active antiretroviral therapy-treated patients. *Retrovirology* 2007;**4**:60.
242. van der Sluis RM, Jeeninga RE, Berkhout B. Establishment and molecular mechanisms of HIV-1 latency in T cells. *Current opinion in virology* 2013.
243. Maldarelli F, Palmer S, King MS, Wiegand A, Polis MA, Mican J, *et al.* ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS pathogens* 2007;**3**:e46.
244. Pierson TC, Zhou Y, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Siliciano RF. Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 2002;**76**:8518-8531.
245. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine* 2009;**15**:893-900.
246. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, *et al.* T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *Journal of virology* 2004;**78**:1160-1168.
247. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997;**387**:183-188.
248. Sedaghat AR, Siliciano JD, Brennan TP, Wilke CO, Siliciano RF. Limits on replenishment of the resting CD4+ T cell reservoir for HIV in patients on HAART. *PLoS pathogens* 2007;**3**:e122.
249. Gale M, Jr., Katze MG. What happens inside lentivirus or influenza virus infected cells: insights into regulation of cellular and viral protein synthesis. *Methods* 1997;**11**:383-401.
250. Williams SA, Greene WC. Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. *Cytokine* 2007;**39**:63-74.
251. Yukl S, Pillai S, Li P, Chang K, Pasutti W, Ahlgren C, *et al.* Latently-infected CD4+ T cells are enriched for HIV-1 Tat variants with impaired transactivation activity. *Virology* 2009;**387**:98-108.
252. Emiliani S, Fischle W, Ott M, Van Lint C, Amella CA, Verdin E. Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line. *Journal of virology* 1998;**72**:1666-1670.
253. Han Y, Lin YB, An W, Xu J, Yang HC, O'Connell K, *et al.* Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough. *Cell host & microbe* 2008;**4**:134-146.
254. Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell host & microbe* 2008;**4**:123-133.
255. Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 2005;**22**:607-619.
256. Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, *et al.* Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic

- tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014,**111**:2307-2312.
257. Keating SM, Jacobs ES, Norris PJ. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine & growth factor reviews* 2012,**23**:193-206.
 258. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, *et al.* Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008,**105**:3879-3884.
 259. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunological reviews* 2013,**254**:326-342.
 260. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine* 1999,**5**:512-517.
 261. Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 2011,**25**:885-897.
 262. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, *et al.* Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 2013,**155**:540-551.
 263. Koelsch KK, Liu L, Haubrich R, May S, Havlir D, Gunthard HF, *et al.* Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro. *The Journal of infectious diseases* 2008,**197**:411-419.
 264. O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *Journal of virology* 2002,**76**:10942-10950.
 265. Lewin SR, Murray JM, Solomon A, Wightman F, Cameron PU, Purcell DJ, *et al.* Virologic determinants of success after structured treatment interruptions of antiretrovirals in acute HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2008,**47**:140-147.
 266. Sharkey M, Babic DZ, Greenough T, Gulick R, Kuritzkes DR, Stevenson M. Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure. *PLoS pathogens* 2011,**7**:e1001303.
 267. Avettand Fenoel V DB, Hocqueloux laurent, Prazuck thierry, Samri Assia, Ménard Adeline, Blanc Catherine, Oualid Florine, Rouzioux Christine, Autran Brigitt and the ALT ANRS CO15 Study Group. An intermediate Subset of Effector-Memory CD4T Cells is the Major Reservoir of HIV in long Term Elite and Viremic Controllers. *CROI 2009* 2009,**ABSTRACT**.
 268. Avettand Fenoel V DB, Hocqueloux laurent, Prazuck thierry, Samri Assia, Ménard Adeline, Blanc Catherine, Oualid Florine, Autran Brigitte, Rouzioux Christine. Stability of HIV reservoir resting CD4 T Cell Subsets under effective HAART. *CROI 2009* 2009,**Abstract**.
 269. Avettand-Fenoel V, Boufassa F, Galimand J, Meyer L, Rouzioux C. HIV-1 DNA for the measurement of the HIV reservoir is predictive of disease progression in seroconverters whatever the mode of result expression is. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2008,**42**:399-404.
 270. Sarmati L, Parisi SG, Montano M, Andreis S, Scaggiante R, Galgani A, *et al.* Nevirapine use, prolonged antiretroviral therapy and high CD4 nadir values are strongly correlated with undetectable HIV-DNA and -RNA levels and CD4 cell gain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012,**67**:2932-2938.
 271. Haim-Boukobza S, Morand-Joubert L, Flandre P, Valin N, Fourati S, Sayon S, *et al.* Higher efficacy of nevirapine than efavirenz to achieve HIV-1 plasma viral load below 1 copy/ml. *AIDS* 2011,**25**:341-344.
 272. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, *et al.* New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of clinical microbiology* 2003,**41**:4531-4536.

273. Pasternak AO, Jurriaans S, Bakker M, Prins JM, Berkhout B, Lukashov VV. Cellular levels of HIV unspliced RNA from patients on combination antiretroviral therapy with undetectable plasma viremia predict the therapy outcome. *PloS one* 2009,**4**:e8490.
274. Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, Pellegrin I, Venet A, Harzic M, *et al.* Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001,**15**:665-673.
275. Josefsson L, Palmer S, Faria NR, Lemey P, Casazza J, Ambrozak D, *et al.* Single cell analysis of lymph node tissue from HIV-1 infected patients reveals that the majority of CD4+ T-cells contain one HIV-1 DNA molecule. *PLoS pathogens* 2013,**9**:e1003432.
276. Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brannstrom J, Shao W, Maldarelli F, *et al.* Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011,**108**:11199-11204.
277. Avettand-Fenoel V, Prazuck T, Hocqueloux L, Melard A, Michau C, Kerdraon R, *et al.* HIV-DNA in rectal cells is well correlated with HIV-DNA in blood in different groups of patients, including long-term non-progressors. *AIDS* 2008,**22**:1880-1882.
278. Avettand-Fenoel V, Bouteloup V, Melard A, Fagard C, Chaix ML, Leclercq P, *et al.* Higher HIV-1 DNA associated with lower gains in CD4 cell count among patients with advanced therapeutic failure receiving optimized treatment (ANRS 123--ETOILE). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010,**65**:2212-2214.
279. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, Theodorou I, *et al.* Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *The Journal of infectious diseases* 2005,**191**:2053-2063.
280. Lambotte O, Delfraissy JF. [HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication]. *Pathologie-biologie* 2006,**54**:566-571.
281. Rouzioux C, Hubert JB, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, *et al.* Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *The Journal of infectious diseases* 2005,**192**:46-55.
282. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, *et al.* HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005,**41**:1053-1056.
283. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Current opinion in immunology* 2006,**18**:399-405.
284. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, *et al.* HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 2004,**21**:757-768.
285. McCune JM, Hanley MB, Cesar D, Halvorsen R, Hoh R, Schmidt D, *et al.* Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *The Journal of clinical investigation* 2000,**105**:R1-8.
286. Dai J, Agosto LM, Baytop C, Yu JJ, Pace MJ, Liszewski MK, *et al.* Human immunodeficiency virus integrates directly into naive resting CD4+ T cells but enters naive cells less efficiently than memory cells. *Journal of virology* 2009,**83**:4528-4537.
287. Fabre-Mersseman V, Dutrieux J, Louise A, Rozlan S, Lamine A, Parker R, *et al.* CD4(+) recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis. *AIDS* 2011,**25**:1153-1162.
288. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, *et al.* Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS pathogens* 2012,**8**:e1002437.

289. Spina CA, Prince HE, Richman DD. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1997;**99**:1774-1785.
290. Okoye AA, Rohankhedkar M, Abana C, Pattenn A, Reyes M, Pexton C, *et al.* Naive T cells are dispensable for memory CD4+ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of experimental medicine* 2012;**209**:641-651.
291. Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, *et al.* Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *The Journal of experimental medicine* 2007;**204**:2171-2185.
292. Descours B, Lambert-Niclot S, Mory B, Samri A, Charlotte F, Peytavin G, *et al.* Direct quantification of cell-associated HIV DNA in isolated rectal and blood memory CD4 T cells revealed their similar and low infection levels in long-term treated HIV-infected patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2013;**62**:255-259.
293. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological reviews* 1997;**156**:145-166.
294. Dybul M, Daucher M, Jensen MA, Hallahan CW, Chun TW, Belson M, *et al.* Genetic characterization of rebounding human immunodeficiency virus type 1 in plasma during multiple interruptions of highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 2003;**77**:3229-3237.
295. Sahu GK, Paar D, Frost SD, Smith MM, Weaver S, Cloyd MW. Low-level plasma HIVs in patients on prolonged suppressive highly active antiretroviral therapy are produced mostly by cells other than CD4 T-cells. *Journal of medical virology* 2009;**81**:9-15.
296. Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *Journal of virology* 1996;**70**:3863-3869.
297. Swingle S, Mann AM, Zhou J, Swingle C, Stevenson M. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS pathogens* 2007;**3**:1281-1290.
298. Aquaro S, Calio R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral research* 2002;**55**:209-225.
299. Perno CF, Newcomb FM, Davis DA, Aquaro S, Humphrey RW, Calio R, *et al.* Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus. *The Journal of infectious diseases* 1998;**178**:413-422.
300. Freed EO, Englund G, Martin MA. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *Journal of virology* 1995;**69**:3949-3954.
301. Lambotte O, Taoufik Y, de Goer MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2000;**23**:114-119.
302. Zhu T. HIV-1 genotypes in peripheral blood monocytes. *Journal of leukocyte biology* 2000;**68**:338-344.
303. Sonza S, Mutimer HP, Oelrichs R, Jardine D, Harvey K, Dunne A, *et al.* Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;**15**:17-22.
304. Delobel P, Sandres-Saune K, Cazabat M, L'Faqihi FE, Aquilina C, Obadia M, *et al.* Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naive and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART. *AIDS* 2005;**19**:1739-1750.
305. Crowe S, Zhu T, Muller WA. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *Journal of leukocyte biology* 2003;**74**:635-641.

306. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 2010,**7**:29.
307. Cimarelli A, Duclos CA, Gessain A, Cattaneo E, Casoli C, Biglione M, *et al.* Quantification of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, central Africans, and Amerindians. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 1995,**10**:198-204.
308. Zhang J, Perelson AS. Contribution of Follicular Dendritic Cells to Persistent HIV Viremia. *Journal of virology* 2013,**87**:7893-7901.
309. Keele BF, Tazi L, Gartner S, Liu Y, Burgon TB, Estes JD, *et al.* Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 2008,**82**:5548-5561.
310. Bernstein HB, Plasterer MC, Schiff SE, Kitchen CM, Kitchen S, Zack JA. CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. *Journal of immunology* 2006,**177**:3669-3676.
311. Valentin A, Rosati M, Patenaude DJ, Hatzakis A, Kostrikis LG, Lazanas M, *et al.* Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002,**99**:7015-7020.
312. Cochrane A, Hughes GJ, Seaton RA, Simmonds P. First evidence of HIV infection of CD8 lymphocytes expressing CD4 during primary HIV-1 infection. *AIDS* 2005,**19**:1237-1239.
313. Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nature medicine* 2001,**7**:459-464.
314. Moir S, Lapointe R, Malaspina A, Ostrowski M, Cole CE, Chun TW, *et al.* CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir. *Journal of virology* 1999,**73**:7972-7980.
315. Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. *The Journal of clinical investigation* 2007,**117**:473-481.
316. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell Jt, Bixby D, Savona MR, *et al.* HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nature medicine* 2010,**16**:446-451.
317. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993,**362**:355-358.
318. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, *et al.* Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993,**362**:359-362.
319. Martinot AJ, Meythaler M, Pozzi LA, Dalecki Boisvert K, Knight H, Walsh D, *et al.* Acute SIV infection in sooty mangabey monkeys is characterized by rapid virus clearance from lymph nodes and absence of productive infection in germinal centers. *PloS one* 2013,**8**:e57785.
320. Tenner-Racz K, Racz P, Gluckman JC, Popovic M. Cell-free HIV in lymph nodes of patients with AIDS and generalized lymphadenopathy. *The New England journal of medicine* 1988,**318**:49-50.
321. Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, van Lunzen J, Schneider C, Jacobs JP, Raschdorff B, *et al.* The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *The Journal of experimental medicine* 1998,**187**:949-959.
322. Burton GF, Keele BF, Estes JD, Thacker TC, Gartner S. Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Seminars in immunology* 2002,**14**:275-284.
323. Ganusov VV, De Boer RJ. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends in immunology* 2007,**28**:514-518.

324. Mehandru S, Dandekar S. Role of the gastrointestinal tract in establishing infection in primates and humans. *Current opinion in HIV and AIDS* 2008;**3**:22-27.
325. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, Duan L, *et al.* Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2010;**202**:1553-1561.
326. Veazey RS, Lackner AA. The gastrointestinal tract and the pathogenesis of AIDS. *AIDS* 1998;**12 Suppl A**:S35-42.
327. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, *et al.* Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2008;**197**:714-720.
328. van Marle G, Gill MJ, Kolodka D, McManus L, Grant T, Church DL. Compartmentalization of the gut viral reservoir in HIV-1 infected patients. *Retrovirology* 2007;**4**:87.
329. Petravic J, Vanderford TH, Silvestri G, Davenport M. Estimating the contribution of the gut to plasma viral load in early SIV infection. *Retrovirology* 2013;**10**:105.
330. Lay MD, Petravic J, Gordon SN, Engram J, Silvestri G, Davenport MP. Is the gut the major source of virus in early simian immunodeficiency virus infection? *Journal of virology* 2009;**83**:7517-7523.
331. Cumont MC, Monceaux V, Viollet L, Lay S, Parker R, Hurtrel B, *et al.* TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell death and differentiation* 2007;**14**:1747-1758.
332. Poles MA, Boscardin WJ, Elliott J, Taing P, Fuerst MM, McGowan I, *et al.* Lack of decay of HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue reservoirs in maximally suppressed individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2006;**43**:65-68.
333. Pudney J, Anderson D. Orchitis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. *The American journal of pathology* 1991;**139**:149-160.
334. Nuovo GJ, Becker J, Simsir A, Margiotta M, Khalife G, Shevchuk M. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *The American journal of pathology* 1994;**144**:1142-1148.
335. Miller CJ, Vogel P, Alexander NJ, Dandekar S, Hendrickx AG, Marx PA. Pathology and localization of simian immunodeficiency virus in the reproductive tract of chronically infected male rhesus macaques. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1994;**70**:255-262.
336. Gupta P, Leroux C, Patterson BK, Kingsley L, Rinaldo C, Ding M, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. *The Journal of infectious diseases* 2000;**182**:79-87.
337. Leruez-Ville M, de Almeida M, Tachet A, Dulioust E, Guibert J, Mandelbrot L, *et al.* Assisted reproduction in HIV-1-serodifferent couples: the need for viral validation of processed semen. *AIDS* 2002;**16**:2267-2273.
338. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, *et al.* Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *Journal of virology* 2002;**76**:9868-9876.
339. Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* 2003;**17**:455-480.
340. Pillai SK, Good B, Pond SK, Wong JK, Strain MC, Richman DD, *et al.* Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env. *Journal of virology* 2005;**79**:1734-1742.

341. Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourneur F, *et al.* Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004,**18**:447-457.
342. Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R, *et al.* Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009,**23**:2050-2054.
343. Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M, *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. *AIDS* 2012,**26**:971-975.
344. Marcelin AG, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS* 2008,**22**:1677-1679.
345. Choo EF, Leake B, Wandel C, Imamura H, Wood AJ, Wilkinson GR, *et al.* Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2000,**28**:655-660.
346. Chan DJ, Ray JE. Quantification of antiretroviral drugs for HIV-1 in the male genital tract: current data, limitations and implications for laboratory analysis. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2007,**59**:1451-1462.
347. Craigo JK, Gupta P. HIV-1 in genital compartments: vexing viral reservoirs. *Current opinion in HIV and AIDS* 2006,**1**:97-102.
348. Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, McArthur JC, Johnson RT, Glass JD. Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Annals of neurology* 1996,**39**:705-711.
349. Cosenza MA, Zhao ML, Si Q, Lee SC. Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. *Brain pathology* 2002,**12**:442-455.
350. Chu L, Wiley HS, Lauffenburger DA. Endocytic Relay as a Potential Means for Enhancing Ligand Transport through Cellular Tissue Matrices: Analysis and Possible Implications for Drug Delivery. *Tissue engineering* 1996,**2**:17-38.
351. Churchill MJ, Gorry PR, Cowley D, Lal L, Sonza S, Purcell DF, *et al.* Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *Journal of neurovirology* 2006,**12**:146-152.
352. Chauhan A, Turchan J, Pocernich C, Bruce-Keller A, Roth S, Butterfield DA, *et al.* Intracellular human immunodeficiency virus Tat expression in astrocytes promotes astrocyte survival but induces potent neurotoxicity at distant sites via axonal transport. *The Journal of biological chemistry* 2003,**278**:13512-13519.
353. Kohleisen B, Neumann M, Herrmann R, Brack-Werner R, Krohn KJ, Ovod V, *et al.* Cellular localization of Nef expressed in persistently HIV-1-infected low-producer astrocytes. *AIDS* 1992,**6**:1427-1436.
354. Churchill M, Nath A. Where does HIV hide? A focus on the central nervous system. *Current opinion in HIV and AIDS* 2013,**8**:165-169.
355. Thompson KA, Churchill MJ, Gorry PR, Sterjovski J, Oelrichs RB, Wesselingh SL, *et al.* Astrocyte specific viral strains in HIV dementia. *Annals of neurology* 2004,**56**:873-877.
356. Lamers SL, Gray RR, Salemi M, Huysentruyt LC, McGrath MS. HIV-1 phylogenetic analysis shows HIV-1 transits through the meninges to brain and peripheral tissues. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2011,**11**:31-37.
357. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, *et al.* Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Archives of neurology* 2008,**65**:65-70.

358. Valcour VG, Ananworanich J, Aghsald M, Sailasuta N, Chalermchai T, Schuetz A, *et al.* HIV DNA Reservoir Increases Risk for Cognitive Disorders in cART-Naive Patients. *PloS one* 2013,**8**:e70164.
359. Vissers M, Stelma FF, Koopmans PP. Could differential virological characteristics account for ongoing viral replication and insidious damage of the brain during HIV 1 infection of the central nervous system? *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2010,**49**:231-238.
360. Lamers SL, Salemi M, Galligan DC, Morris A, Gray R, Fogel G, *et al.* Human immunodeficiency virus-1 evolutionary patterns associated with pathogenic processes in the brain. *Journal of neurovirology* 2010,**16**:230-241.
361. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997,**277**:112-116.
362. Putter H, Prins JM, Jurriaans S, Roos M, Ferguson NM, van Praag R, *et al.* Slower decline of plasma HIV-1 RNA following highly suppressive antiretroviral therapy in primary compared with chronic infection. *AIDS* 2000,**14**:2831-2839.
363. Ledergerber B, Egger M, Opravil M, Telenti A, Hirschel B, Battegay M, *et al.* Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 1999,**353**:863-868.
364. Palella FJ, Jr., Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, *et al.* Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2006,**43**:27-34.
365. Kinloch-de Loes S. Treatment of acute HIV-1 infection: is it coming of age? *The Journal of infectious diseases* 2006,**194**:721-724.
366. Smith DE, Walker BD, Cooper DA, Rosenberg ES, Kaldor JM. Is antiretroviral treatment of primary HIV infection clinically justified on the basis of current evidence? *AIDS* 2004,**18**:709-718.
367. Cellerai C, Little SJ, Loes SK. Treatment of acute HIV-1 infection: are we getting there? *Current opinion in HIV and AIDS* 2008,**3**:67-74.
368. Bell SK, Little SJ, Rosenberg ES. Clinical management of acute HIV infection: best practice remains unknown. *The Journal of infectious diseases* 2010,**202 Suppl 2**:S278-288.
369. Walker BD, Hirsch MS. Antiretroviral therapy in early HIV infection. *The New England journal of medicine* 2013,**368**:279-281.
370. Fidler S, Fox J, Touloumi G, Pantazis N, Porter K, Babiker A, *et al.* Slower CD4 cell decline following cessation of a 3 month course of HAART in primary HIV infection: findings from an observational cohort. *AIDS* 2007,**21**:1283-1291.
371. Hecht FM, Wang L, Collier A, Little S, Markowitz M, Margolick J, *et al.* A multicenter observational study of the potential benefits of initiating combination antiretroviral therapy during acute HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 2006,**194**:725-733.
372. Le T, Wright EJ, Smith DM, He W, Catano G, Okulicz JF, *et al.* Enhanced CD4+ T-cell recovery with earlier HIV-1 antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine* 2013,**368**:218-230.
373. Pantazis N, Touloumi G, Vanhems P, Gill J, Bucher HC, Porter K. The effect of antiretroviral treatment of different durations in primary HIV infection. *AIDS* 2008,**22**:2441-2450.
374. Seng R, Goujard C, Desquilbet L, Sinet M, Rouzioux C, Deveau C, *et al.* Rapid CD4+ cell decrease after transient cART initiated during primary HIV infection (ANRS PRIMO and SEROCO cohorts). *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2008,**49**:251-258.
375. Streeck H, Jessen H, Alter G, Teigen N, Waring MT, Jessen A, *et al.* Immunological and virological impact of highly active antiretroviral therapy initiated during acute HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 2006,**194**:734-739.
376. Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Melard A, *et al.* Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low

- HIV reservoirs and normal T cell counts. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013,**68**:1169-1178.
377. Lampe FC, Porter K, Kaldor J, Law M, Kinloch-de Loes S, Phillips AN. Effect of transient antiretroviral treatment during acute HIV infection: comparison of the Quest trial results with CASCADE natural history study. *Antiviral therapy* 2007,**12**:189-193.
 378. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, *et al.* Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000,**407**:523-526.
 379. Steingrover R, Garcia EF, van Valkengoed IG, Bekker V, Bezemer D, Kroon FP, *et al.* Transient lowering of the viral set point after temporary antiretroviral therapy of primary HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses* 2010,**26**:379-387.
 380. Volberding P, Demeter L, Bosch RJ, Aga E, Pettinelli C, Hirsch M, *et al.* Antiretroviral therapy in acute and recent HIV infection: a prospective multicenter stratified trial of intentionally interrupted treatment. *AIDS* 2009,**23**:1987-1995.
 381. Hocqueloux L, Prazuck T, Avettand-Fenoel V, Lafeuillade A, Cardon B, Viard JP, *et al.* Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS* 2010,**24**:1598-1601.
 382. Desquilbet L, Goujard C, Rouzioux C, Sinet M, Deveau C, Chaix ML, *et al.* Does transient HAART during primary HIV-1 infection lower the virological set-point? *AIDS* 2004,**18**:2361-2369.
 383. Kaufmann DE, Lichterfeld M, Altfeld M, Addo MM, Johnston MN, Lee PK, *et al.* Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS medicine* 2004,**1**:e36.
 384. Kinloch-de Loes S, Hoen B, Smith DE, Autran B, Lampe FC, Phillips AN, *et al.* Impact of therapeutic immunization on HIV-1 viremia after discontinuation of antiretroviral therapy initiated during acute infection. *The Journal of infectious diseases* 2005,**192**:607-617.
 385. Hoen B, Fournier I, Lacabaratz C, Burgard M, Charreau I, Chaix ML, *et al.* Structured treatment interruptions in primary HIV-1 infection: the ANRS 100 PRIMSTOP trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2005,**40**:307-316.
 386. Markowitz M, Jin X, Hurley A, Simon V, Ramratnam B, Louie M, *et al.* Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination. *The Journal of infectious diseases* 2002,**186**:634-643.
 387. Wyl V, Gianella S, Fischer M, Niederoest B, Kuster H, Battegay M, *et al.* Early antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection results in a transient reduction of the viral setpoint upon treatment interruption. *PloS one* 2011,**6**:e27463.
 388. Hogan CM, Degruittola V, Sun X, Fiscus SA, Del Rio C, Hare CB, *et al.* The setpoint study (ACTG A5217): effect of immediate versus deferred antiretroviral therapy on virologic set point in recently HIV-1-infected individuals. *The Journal of infectious diseases* 2012,**205**:87-96.
 389. Grijzen M, Koster G, van Vonderen M, van Kasteren M, Kootstra G, Steingrover R, *et al.* Temporary antiretroviral treatment during primary HIV-1 infection has a positive impact on health-related quality of life: data from the Primo-SHM cohort study. *HIV medicine* 2012,**13**:630-635.
 390. Fidler S, Porter K, Ewings F, Frater J, Ramjee G, Cooper D, *et al.* Short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection. *The New England journal of medicine* 2013,**368**:207-217.
 391. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2012,**308**:387-402.
 392. [Consensus Statement by GeSIDA/National AIDS Plan Secretariat on antiretroviral treatment in adults infected by the human immunodeficiency virus (Updated January 2013)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013,**31**:602 e601-602 e698.
 393. EACS. guidelines for the treatment of HIV infected adult in Europe. 2013, October:P.9.

394. Panel on antiretroviral guidelines for Adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. department of Healths and Human services. 2013, August.
395. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997,**278**:1447-1450.
396. Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, O'Callaghan CA, Kelleher AD, Whelan JA, *et al.* Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000,**97**:3382-3387.
397. Malhotra U, Berrey MM, Huang Y, Markee J, Brown DJ, Ap S, *et al.* Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* 2000,**181**:121-131.
398. Al-Harhi L, Siegel J, Spritzler J, Pottage J, Agnoli M, Landay A. Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS* 2000,**14**:761-770.
399. Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Sicard D, Salmon D, Delfraissy JF, *et al.* Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *Journal of virology* 1999,**73**:7108-7116.
400. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, *et al.* Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *Journal of virology* 1999,**73**:797-800.
401. Casazza JP, Betts MR, Picker LJ, Koup RA. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 2001,**75**:6508-6516.
402. Barbour JD, Hecht FM, Little SJ, Markowitz M, Daar ES, Kelleher AD, *et al.* Greater CD4 T-cell gains after one year of antiretroviral therapy are associated with lower HIV-1 pol replication capacity. *AIDS* 2006,**20**:2123-2125.
403. Lacabartz-Porret C, Viard JP, Goujard C, Levy Y, Rodallec A, Deveau C, *et al.* Presence of HIV-specific CD4+ T-cell responses in HIV-infected subjects with sustained virologic control after highly active antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2004,**36**:594-599.
404. Ndongala ML, Peretz Y, Boulet S, Doroudchi M, Yassine-Diab B, Boulassel MR, *et al.* HIV Gag p24 specific responses secreting IFN-gamma and/or IL-2 in treatment-naïve individuals in acute infection early disease (AIED) are associated with low viral load. *Clinical immunology* 2009,**131**:277-287.
405. Lecuroux C, Girault I, Urrutia A, Doisne JM, Deveau C, Goujard C, *et al.* Identification of a particular HIV-specific CD8+ T-cell subset with a CD27+ CD45RO-/RA+ phenotype and memory characteristics after initiation of HAART during acute primary HIV infection. *Blood* 2009,**113**:3209-3217.
406. Carcelain G, Blanc C, Leibowitch J, Mariot P, Mathez D, Schneider V, *et al.* T cell changes after combined nucleoside analogue therapy in HIV primary infection. *AIDS* 1999,**13**:1077-1081.
407. Lelievre JD, Melica G, Itti E, Lacabartz C, Rozlan S, Wiedemann A, *et al.* Initiation of c-ART in HIV-1 infected patients is associated with a decrease of the metabolic activity of the thymus evaluated using FDG-PET/computed tomography. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2012,**61**:56-63.
408. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, de Souza M, Rerknimitr R, *et al.* Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PloS one* 2012,**7**:e33948.

409. Regidor DL, Detels R, Breen EC, Widney DP, Jacobson LP, Palella F, *et al.* Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. *AIDS* 2011,**25**:303-314.
410. Barqasho B, Nowak P, Tjernlund A, Kinloch S, Goh LE, Lampe F, *et al.* Kinetics of plasma cytokines and chemokines during primary HIV-1 infection and after analytical treatment interruption. *HIV medicine* 2009,**10**:94-102.
411. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 is associated with viral load and disease progression in HIV-1-infected patients. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2004,**6**:1273-1277.
412. Cellerai C, Harari A, Stauss H, Yerly S, Geretti AM, Carroll A, *et al.* Early and prolonged antiretroviral therapy is associated with an HIV-1-specific T-cell profile comparable to that of long-term non-progressors. *PloS one* 2011,**6**:e18164.
413. Poizot-Martin I, Faucher O, Obry-Roguet V, Nicolino-Brunet C, Ronot-Bregigeeon S, Dignat-George F, *et al.* Lack of correlation between the size of HIV proviral DNA reservoir and the level of immune activation in HIV-infected patients with a sustained undetectable HIV viral load for 10 years. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2013,**57**:351-355.
414. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses* 2004,**20**:227-233.
415. Vasan S, Poles MA, Horowitz A, Siladji EE, Markowitz M, Tsuji M. Function of NKT cells, potential anti-HIV effector cells, are improved by beginning HAART during acute HIV-1 infection. *International immunology* 2007,**19**:943-951.
416. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, *et al.* B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* 2010,**116**:5571-5579.
417. Leruez-Ville M, Duloust E, Costabliola D, Salmon D, Tachet A, Finkielsztejn L, *et al.* Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study (ANRS EP012). *AIDS* 2002,**16**:486-488.
418. Vernazza PL, Troiani L, Flepp MJ, Cone RW, Schock J, Roth F, *et al.* Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 2000,**14**:117-121.
419. O'Brien M, Markowitz M. Should we treat acute HIV infection? *Current HIV/AIDS reports* 2012,**9**:101-110.
420. El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, *et al.* CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *The New England journal of medicine* 2006,**355**:2283-2296.
421. Metzner KJ, Scherrer AU, Preiswerk B, Joos B, von Wyl V, Leemann C, *et al.* Origin of Minority Drug-Resistant HIV-1 Variants in Primary HIV-1 Infection. *The Journal of infectious diseases* 2013.
422. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* 2008,**16**:266-285.
423. Devereux HL, Youle M, Johnson MA, Loveday C. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999,**13**:F123-127.
424. Delaugerre C, Valantin MA, Mouroux M, Bonmarchand M, Carcelain G, Duvivier C, *et al.* Re-occurrence of HIV-1 drug mutations after treatment re-initiation following interruption in patients with multiple treatment failure. *AIDS* 2001,**15**:2189-2191.

425. Chan KC, Galli RA, Montaner JS, Harrigan PR. Prolonged retention of drug resistance mutations and rapid disease progression in the absence of therapy after primary HIV infection. *AIDS* 2003,**17**:1256-1258.
426. Little SJ, Frost SD, Wong JK, Smith DM, Pond SL, Ignacio CC, *et al.* Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary human immunodeficiency virus infection. *Journal of virology* 2008,**82**:5510-5518.
427. Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, *et al.* Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *The New England journal of medicine* 2002,**347**:385-394.
428. Brenner B, Routy JP, Quan Y, Moisi D, Oliveira M, Turner D, *et al.* Persistence of multidrug-resistant HIV-1 in primary infection leading to superinfection. *AIDS* 2004,**18**:1653-1660.
429. Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP, *et al.* Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 2004,**18**:1683-1689.
430. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS research and human retroviruses* 1998,**14**:869-876.
431. Buzon MJ, Codoner FM, Frost SD, Pou C, Puertas MC, Massanella M, *et al.* Deep molecular characterization of HIV-1 dynamics under suppressive HAART. *PLoS pathogens* 2011,**7**:e1002314.
432. Nicot F, Saliou A, Raymond S, Saune K, Dubois M, Massip P, *et al.* Minority variants associated with resistance to HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors during primary infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2012,**55**:107-113.
433. Uy J, Armon C, Buchacz K, Wood K, Brooks JT. Initiation of HAART at higher CD4 cell counts is associated with a lower frequency of antiretroviral drug resistance mutations at virologic failure. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2009,**51**:450-453.
434. L. Josefsson, S. Eriksson, E. Sinclair, T. Ho MK, L. Epling, A. Tan, *et al.* Characterization of persistent HIV-1 in a broad spectrum of CD4+ T cells isolated from peripheral blood and gut associated lymphoid tissue from patients on long-term suppressive therapy. In: *CROI*. Washington; 2012.
435. Evering TH, Mehandru S, Racz P, Tenner-Racz K, Poles MA, Figueroa A, *et al.* Absence of HIV-1 evolution in the gut-associated lymphoid tissue from patients on combination antiviral therapy initiated during primary infection. *PLoS pathogens* 2012,**8**:e1002506.
436. Kottitil S, Shin K, Jackson JO, Reitano KN, O'Shea MA, Yang J, *et al.* Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *Journal of immunology* 2006,**176**:1107-1114.
437. Kassutto S, Rosenberg ES. Editorial comment: treatment of acute HIV infection--uncertainties about best practice. *The AIDS reader* 2005,**15**:250-251.
438. Koegl C, Wolf E, Hanhoff N, Jessen H, Schewe K, Rausch M, *et al.* Treatment during primary HIV infection does not lower viral set point but improves CD4 lymphocytes in an observational cohort. *European journal of medical research* 2009,**14**:277-283.
439. Berrey MM, Schacker T, Collier AC, Shea T, Brodie SJ, Mayers D, *et al.* Treatment of primary human immunodeficiency virus type 1 infection with potent antiretroviral therapy reduces frequency of rapid progression to AIDS. *J Infect Dis* 2001,**183**:1466-1475.
440. Sailasuta N, Ross W, Ananworanich J, Chalermchai T, Degruittola V, Lerdlum S, *et al.* Change in Brain Magnetic Resonance Spectroscopy after Treatment during Acute HIV Infection. *PLoS One* 2012,**7**:e49272.
441. Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, Marovich M, Lerdlum S, Suttichom D, *et al.* Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 2012,**206**:275-282.

442. Garvey LJ, Pavese N, Ramlackhansingh A, Thomson E, Allsop JM, Politis M, *et al.* Acute HCV/HIV coinfection is associated with cognitive dysfunction and cerebral metabolite disturbance, but not increased microglial cell activation. *PloS one* 2012,**7**:e38980.
443. Geeraert L, Kraus G, Pomerantz RJ. Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annual review of medicine* 2008,**59**:487-501.
444. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, *et al.* Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997,**387**:188-191.
445. Sigal A, Kim JT, Balazs AB, Dekel E, Mayo A, Milo R, *et al.* Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 2011,**477**:95-98.
446. Havlir DV, Koelsch KK, Strain MC, Margot N, Lu B, Ignacio CC, *et al.* Predictors of residual viremia in HIV-infected patients successfully treated with efavirenz and lamivudine plus either tenofovir or stavudine. *The Journal of infectious diseases* 2005,**191**:1164-1168.
447. Havlir DV, Strain MC, Clerici M, Ignacio C, Trabatttoni D, Ferrante P, *et al.* Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *Journal of virology* 2003,**77**:11212-11219.
448. Ramratnam B, Ribeiro R, He T, Chung C, Simon V, Vanderhoeven J, *et al.* Intensification of antiretroviral therapy accelerates the decay of the HIV-1 latent reservoir and decreases, but does not eliminate, ongoing virus replication. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2004,**35**:33-37.
449. North TW, Higgins J, Deere JD, Hayes TL, Villalobos A, Adamson L, *et al.* Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS. *Journal of virology* 2010,**84**:2913-2922.
450. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Neilands TB, Kelley CF, *et al.* Evidence of persistent low-level viremia in long-term HAART-suppressed, HIV-infected individuals. *AIDS* 2010,**24**:2535-2539.
451. Bonora S, Nicastrì E, Calcagno A, Gonzalez de Requena D, D'Ettorre G, Sarmati L, *et al.* Ultrasensitive assessment of residual HIV viraemia in HAART-treated patients with persistently undetectable plasma HIV-RNA: a cross-sectional evaluation. *Journal of medical virology* 2009,**81**:400-405.
452. Palmisano L, Giuliano M, Nicastrì E, Pirillo MF, Andreotti M, Galluzzo CM, *et al.* Residual viraemia in subjects with chronic HIV infection and viral load < 50 copies/ml: the impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2005,**19**:1843-1847.
453. Lambert-Niclot S, Flandre P, Valantin MA, Peytavin G, Duivivier C, Haim-Boukobza S, *et al.* Factors associated with virological failure in HIV-1-infected patients receiving darunavir/ritonavir monotherapy. *The Journal of infectious diseases* 2011,**204**:1211-1216.
454. Palmer S, Josefsson L, Coffin JM. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *Journal of internal medicine* 2011,**270**:550-560.
455. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir DV, Gunthard HF, Lam RY, *et al.* Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *The Journal of infectious diseases* 2005,**191**:1410-1418.
456. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, *et al.* Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS* 2004,**18**:45-49.
457. Schmid A, Gianella S, von Wyl V, Metzner KJ, Scherrer AU, Niederost B, *et al.* Profound depletion of HIV-1 transcription in patients initiating antiretroviral therapy during acute infection. *PloS one* 2010,**5**:e13310.
458. Mexas AM, Graf EH, Pace MJ, Yu JJ, Papasavvas E, Azzoni L, *et al.* Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials. *AIDS* 2012,**26**:2295-2306.

459. Goujard C, Emilie D, Roussillon C, Godot V, Rouzioux C, Venet A, *et al.* Continuous versus intermittent treatment strategies during primary HIV-1 infection: the randomized ANRS INTERPRIM Trial. *AIDS* 2012,**26**:1895-1905.
460. Buzon MJSK SA, Pereyra P, Rosenberg E, Yu XG, Lichterfeld M. Reduced HIV-1 reservoir size after 10 years of sup-pressive antiretroviral therapy in patients initiating treatment during primary infection. In: *The Fifth International Workshop on HIV Persistence During Therapy*; 2011.
461. Strain MC, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Smith DM, Leigh-Brown AJ, *et al.* Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003,**100**:4819-4824.
462. Archin NM, Vaidya NK, Kuruc JD, Liberty AL, Wiegand A, Kearney MF, *et al.* Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012,**109**:9523-9528.
463. Yerly S, Perneger TV, Vora S, Hirschel B, Perrin L. Decay of cell-associated HIV-1 DNA correlates with residual replication in patients treated during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2000,**14**:2805-2812.
464. Chun TW, Murray D, Justement JS, Hallahan CW, Moir S, Kovacs C, *et al.* Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* 2011,**204**:135-138.
465. Yerly S, Kaiser L, Perneger TV, Cone RW, Opravil M, Chave JP, *et al.* Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 2000,**14**:243-249.
466. Ananworanich J, Puthanakit T, Suntarattiwong P, Chokephaibulkit K, Kerr SJ, Fromentin R, *et al.* Reduced markers of HIV persistence and restricted HIV-specific immune responses after early antiretroviral therapy in children. *AIDS* 2013.
467. Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, *et al.* Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infect Dis* 2011,**11**:146.
468. Puertas MC, Massanella M, Llibre JM, Ballester M, Buzon MJ, Ouchi D, *et al.* Intensification of a raltegravir-based regimen with maraviroc in early HIV-1 infection. *AIDS* 2013.
469. Markowitz M, Evering TH, Garmon D, Caskey M, La Mar M, Rodriguez K, *et al.* A Randomized Open-Label Study of Three- versus Five-Drug Combination Antiretroviral Therapy in Newly HIV-1 Infected Individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2014.
470. Lisiewicz J, Rosenberg E, Lieberman J, Jessen H, Lopalco L, Siliciano R, *et al.* Control of HIV despite the discontinuation of antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine* 1999,**340**:1683-1684.
471. Goujard C, Girault I, Rouzioux C, Lecuroux C, Deveau C, Chaix ML, *et al.* HIV-1 control after transient antiretroviral treatment initiated in primary infection: role of patient characteristics and effect of therapy. *Antiviral therapy* 2012,**17**:1001-1009.
472. Paci P, Martini F, Bernaschi M, D'Offizi G, Castiglione F. Timely HAART initiation may pave the way for a better viral control. *BMC infectious diseases* 2011,**11**:56.
473. Steingrover R, Pogany K, Fernandez Garcia E, Jurriaans S, Brinkman K, Schuitemaker H, *et al.* HIV-1 viral rebound dynamics after a single treatment interruption depends on time of initiation of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2008,**22**:1583-1588.
474. Lodi S, Meyer L, Kelleher AD, Rosinska M, Ghosn J, Sannes M, *et al.* Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion. *Archives of internal medicine* 2012,**172**:1252-1255.
475. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, *et al.* Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of

- early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS pathogens* 2013,**9**:e1003211.
476. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 2009,**23**:1163-1169.
 477. Dalmaso C, Carpentier W, Meyer L, Rouzioux C, Goujard C, Chaix ML, *et al.* Distinct genetic loci control plasma HIV-RNA and cellular HIV-DNA levels in HIV-1 infection: the ANRS Genome Wide Association 01 study. *PloS one* 2008,**3**:e3907.
 478. Mahajan VS, Leskov IB, Chen JZ. Homeostasis of T cell diversity. *Cellular & molecular immunology* 2005,**2**:1-10.
 479. Ananworanich J. Early ART Intervention restricts the seeding of the HIV reservoir in Long-lived central Memory CD4 T Cells. In: *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)*; 2013.
 480. Sadora DL, Allan JS, Apetrei C, Brenchley JM, Douek DC, Else JG, *et al.* Toward an AIDS vaccine: lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nature medicine* 2009,**15**:861-865.
 481. Verhoeven D, Sankaran S, Dandekar S. Simian immunodeficiency virus infection induces severe loss of intestinal central memory T cells which impairs CD4+ T-cell restoration during antiretroviral therapy. *Journal of medical primatology* 2007,**36**:219-227.
 482. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, Jr., Chun TW, *et al.* Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *The New England journal of medicine* 2013,**369**:1828-1835.
 483. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 2003,**77**:11708-11717.
 484. Schieferdecker HL, Ullrich R, Hirsland H, Zeitz M. T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria. *Journal of immunology* 1992,**149**:2816-2822.
 485. Batman PA, Kapembwa MS, Belmonte L, Tudor G, Kotler DP, Potten CS, *et al.* HIV enteropathy: HAART reduces HIV-induced stem cell hyperproliferation and crypt hypertrophy to normal in jejunal mucosa. *Journal of clinical pathology* 2013.
 486. Belmonte L, Olmos M, Fanin A, Parodi C, Bare P, Concetti H, *et al.* The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART. *AIDS* 2007,**21**:2106-2108.
 487. Verhoeven D, Sankaran S, Silvey M, Dandekar S. Antiviral therapy during primary simian immunodeficiency virus infection fails to prevent acute loss of CD4+ T cells in gut mucosa but enhances their rapid restoration through central memory T cells. *Journal of virology* 2008,**82**:4016-4027.
 488. George MD, Reay E, Sankaran S, Dandekar S. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. *Journal of virology* 2005,**79**:2709-2719.
 489. Cohen J. HIV/AIDS research. Tissue says blood is misleading, confusing HIV cure efforts. *Science* 2011,**334**:1614.
 490. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, *et al.* Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *Journal of immunology* 2009,**182**:7828-7837.
 491. Hunt PW, Shulman NS, Hayes TL, Dahl V, Somsouk M, Funderburg NT, *et al.* The immunologic effects of maraviroc intensification in treated HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T-cell recovery: a randomized trial. *Blood* 2013,**121**:4635-4646.
 492. Cuzin L, Trabelsi S, Delobel P, Barbuat C, Reynes J, Allavena C, *et al.* Maraviroc intensification of stable antiviral therapy in HIV-1-infected patients with poor immune restoration:

- MARIMUNO-ANRS 145 study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2012,**61**:557-564.
493. Ambrosioni J, Junier T, Delhumeau C, Calmy A, Hirschel B, Zdobnov E, *et al.* Impact of highly active antiretroviral therapy on the molecular epidemiology of newly diagnosed HIV infections. *AIDS* 2012,**26**:2079-2086.
 494. Fisher M, Pao D, Brown AE, Sudarshi D, Gill ON, Cane P, *et al.* Determinants of HIV-1 transmission in men who have sex with men: a combined clinical, epidemiological and phylogenetic approach. *AIDS* 2010,**24**:1739-1747.
 495. Yerly S, Junier T, Gayet-Ageron A, Amari EB, von Wyl V, Gunthard HF, *et al.* The impact of transmission clusters on primary drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *AIDS* 2009,**23**:1415-1423.
 496. Centlivre M, Legrand N, Steingrover R, van der Sluis R, Grijzen ML, Bakker M, *et al.* Altered dynamics and differential infection profiles of lymphoid and myeloid cell subsets during acute and chronic HIV-1 infection. *Journal of leukocyte biology* 2011,**89**:785-795.
 497. Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature reviews. Immunology* 2005,**5**:783-792.
 498. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature medicine* 2003,**9**:727-728.
 499. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, *et al.* Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *The Journal of infectious diseases* 2013,**208**:1202-1211.
 500. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, *et al.* HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *The Journal of clinical investigation* 2005,**115**:3250-3255.
 501. Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, Albrecht H, Belonosova E, Gatell JM, *et al.* Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet infectious diseases* 2013,**13**:927-935.
 502. Walmsley SL, Antela A, Clumeck N, Duiculescu D, Eberhard A, Gutierrez F, *et al.* Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* 2013,**369**:1807-1818.
 503. Greener BN, Patterson KB, Prince HM, Sykes CS, Adams JL, Dumond JB, *et al.* Dolutegravir pharmacokinetics in the genital tract and colorectum of HIV-negative men after single and multiple dosing. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2013,**64**:39-44.
 504. Adams JL, Patterson KB, Prince HM, Sykes C, Greener BN, Dumond JB, *et al.* Single and multiple dose pharmacokinetics of dolutegravir in the genital tract of HIV-negative women. *Antiviral therapy* 2014,**18**:1005-1013.
 505. Letendre S. Distribution and Antiviral Activity in Cerebrospinal Fluid (CSF) of the Integrase Inhibitor, Dolutegravir (DTG): ING116070 Week 16 Results In: *CROI*. Atlanta; 2013.
 506. Markowitz M, Zolopa A, Squires K, Ruane P, Coakley D, Kearney B, *et al.* Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and antiretroviral activity of tenofovir alafenamide, a new prodrug of the HIV reverse transcriptase inhibitor tenofovir, in HIV-infected adults. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014.
 507. Chun TW, Engel D, Mizell SB, Hallahan CW, Fischette M, Park S, *et al.* Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nature medicine* 1999,**5**:651-655.
 508. Vandergaeten C, Fromentin R, DaFonseca S, Lawani MB, Sereti I, Lederman MM, *et al.* Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood* 2013,**121**:4321-4329.

- 509. Sagot-Lerolle N, Lamine A, Chaix ML, Boufassa F, Aboulker JP, Costagliola D, *et al.* Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir. *AIDS* 2008,**22**:1125-1129.
- 510. Armijo E, Soto C, Davis BR. HIV/AIDS: modified stem cells in the spotlight. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014.
- 511. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 2009,**360**:692-698.
- 512. Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang HC, *et al.* Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity* 2012,**36**:491-501.
- 513. Branson BM, Stekler JD. Detection of acute HIV infection: we can't close the window. *The Journal of infectious diseases* 2012,**205**:521-524.

Résumé :

La primo-infection est un moment critique de l'établissement du réservoir justifiant de l'initiation d'un traitement précoce.

Nous avons initié un essai randomisé évaluant l'impact de deux ans d'un traitement antirétroviral intense (essai ANRS147 OPTIPRIM, trithérapie *versus* pentathérapie) sur le réservoir et avons initié des études physiopathologiques au cours de cet essai.

Nous montrons ainsi la faible diversité génétique des virus en primo-infection dans les compartiments sanguins et rectaux. Le réservoir s'établit dès le premier mois de l'infection par diffusion d'un cluster viral homogène au sein des lymphocytaires T CD4 naïfs (TN) et mémoires centrales (TCM), transitionnelles (TTM), effectrices (TEM) quiescents. Il en résulte une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire associée à une faible contribution au réservoir des cellules peu différenciées à longue demi-vie, TN et TCM. Par ailleurs nous montrons que la majorité des patients au moment de leur primo-infection n'ont pas la capacité de développer des réponses T CD8 à même de supprimer la réplication virale comme chez les patients *HIV Controllers*. Après deux ans de traitement, nous observons que la diversité virale n'a pas évolué, par contre la taille du réservoir est fortement réduite. Les anomalies de l'homéostasie lymphocytaire T CD4 persistent, par contre le traitement très précoce a permis de protéger les TN et TCM. Il n'y a pas de bénéfice additionnel d'une pentathérapie mais nous avons validé le concept qu'un traitement précoce permet d'induire un contrôle virologique au long cours après arrêt de traitement. Nos résultats indiquent qu'un traitement plus long que deux ans permettrait de renforcer la diminution du réservoir.

Ces résultats seront à prendre en compte pour l'élaboration de futurs essais en primo-infection visant à réduire le réservoir pour une rémission au long cours.

Title : Study of the establishment of the HIV-1 reservoirs at the time of the primary infection and impact of a Highly Active Anti-retroviral Therapy on these reservoirs

Abstract :

HIV primary infection is a critical period in the establishment of the reservoirs that justifies the initiation of an early treatment.

We started a randomised trial to assess the impact of a two-year intense HAART (ANRS147 OPTIPRIM trial: five-drug therapy *versus* three-drug therapy) on the blood reservoir; within this trial, we included some pathophysiological studies.

Thus, we show that during the primary infection, viruses have a low genetic diversity in blood and rectal compartments. The reservoir establishes itself as early as the first month of the infection by spreading a homogeneous viral cluster in CD4 T cells subsets, naive T cells (TN), central memories (TCM), transitional memories (TTM), effector memories (TEM), and resting T cells. This results in a disruption of the lymphocyte homeostasis, linked to the low contribution to the reservoir of TN and TCM, which are little differentiated cells with long half-lives. Moreover, we show that, at the time of the primary infection, the majority of patients do not have the ability to develop CD8 T cells responses that could suppress the viral replication, as *HIV Controllers* patients do. After two years of treatment, we observe that there is no evolution of the viral diversity, but the size of the reservoir is significantly reduced. The abnormalities of the CD4 T cells lymphocyte homeostasis remain, but the very early treatment was able to protect the TN and TCM. The five-drug therapy does not have any additional benefit, but we confirm the idea that early treatment can induce long-term virological control after the discontinuation of the treatment. Our results show that a treatment lasting more than two years would be able to reinforce the reduction of the reservoir.

These results should be taken into account in the development of future trials aiming to reduce the reservoir in patients treated at the time of primary infection for a sustainable remission.

Key words: HIV reservoir, primary infection, early treatment, viral diversity, T cells subsets infection

Mots clés : Réservoir VIH, Primo-infection, traitement précoce, diversité virologique, infection des sous-populations lymphocytaires

Résumé :

La primo-infection est un moment critique de l'établissement du réservoir justifiant de l'initiation d'un traitement précoce.

Nous avons initié un essai randomisé évaluant l'impact de deux ans d'un traitement antirétroviral intense (essai ANRS147 OPTIPRIM, trithérapie *versus* pentathérapie) sur le réservoir et avons initié des études physiopathologiques au cours de cet essai.

Nous montrons ainsi la faible diversité génétique des virus en primo-infection dans les compartiments sanguins et rectaux. Le réservoir s'établit dès le premier mois de l'infection par diffusion d'un cluster viral homogène au sein des lymphocytaires T CD4 naïfs (TN) et mémoires centrales (TCM), transitionnelles (TTM), effectrices (TEM) quiescents. Il en résulte une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire associée à une faible contribution au réservoir des cellules peu différenciées à longue demi-vie, TN et TCM. Par ailleurs nous montrons que la majorité des patients au moment de leur primo-infection n'ont pas la capacité de développer des réponses T CD8 à même de supprimer la réplication virale comme chez les patients *HIV Controllers*. Après deux ans de traitement, nous observons que la diversité virale n'a pas évolué, par contre la taille du réservoir est fortement réduite. Les anomalies de l'homéostasie lymphocytaire T CD4 persistent, par contre le traitement très précoce a permis de protéger les TN et TCM. Il n'y a pas de bénéfice additionnel d'une pentathérapie mais nous avons validé le concept qu'un traitement précoce permet d'induire un contrôle virologique au long cours après arrêt de traitement. Nos résultats indiquent qu'un traitement plus long que deux ans permettrait de renforcer la diminution du réservoir.

Ces résultats seront à prendre en compte pour l'élaboration de futurs essais en primo-infection visant à réduire le réservoir pour une rémission au long cours.

Title : Study of the establishment of the HIV-1 reservoirs at the time of the primary infection and impact of a Highly Active Anti-retroviral Therapy on these reservoirs

Abstract :

HIV primary infection is a critical period in the establishment of the reservoirs that justifies the initiation of an early treatment.

We started a randomised trial to assess the impact of a two-year intense HAART (ANRS147 OPTIPRIM trial: five-drug therapy *versus* three-drug therapy) on the blood reservoir; within this trial, we included some pathophysiological studies.

Thus, we show that during the primary infection, viruses have a low genetic diversity in blood and rectal compartments. The reservoir establishes itself as early as the first month of the infection by spreading a homogeneous viral cluster in CD4 T cells subsets, naive T cells (TN), central memories (TCM), transitional memories (TTM), effector memories (TEM), and resting T cells. This results in a disruption of the lymphocyte homeostasis, linked to the low contribution to the reservoir of TN and TCM, which are little differentiated cells with long half-lives. Moreover, we show that, at the time of the primary infection, the majority of patients do not have the ability to develop CD8 T cells responses that could suppress the viral replication, as *HIV Controllers* patients do. After two years of treatment, we observe that there is no evolution of the viral diversity, but the size of the reservoir is significantly reduced. The abnormalities of the CD4 T cells lymphocyte homeostasis remain, but the very early treatment was able to protect the TN and TCM. The five-drug therapy does not have any additional benefit, but we confirm the idea that early treatment can induce long-term virological control after the discontinuation of the treatment. Our results show that a treatment lasting more than two years would be able to reinforce the reduction of the reservoir.

These results should be taken into account in the development of future trials aiming to reduce the reservoir in patients treated at the time of primary infection for a sustainable remission.

Key words: HIV reservoir, primary infection, early treatment, viral diversity, T cells subsets infection

Mots clés : Réservoir VIH, Primo-infection, traitement précoce, diversité virologique, infection des sous-populations lymphocytaires